



Leonardo Zanovello

Produção de fitase e detoxificação do subproduto agroindustrial de
tungue por *Paecilomyces variotii*.

Campinas

2013

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos**

Leonardo Zanovello

Produção de fitase e detoxificação do subproduto agroindustrial de
tungue por *Paecilomyces variotii*.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO LEONARDO
ZANOVELLO, ORIENTADO PELA PROFA.
DRA. GABRIELA ALVES MACEDO.

**Campinas
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

Zanovello, Leonardo, 1987-

Z17p Produção de fitase e detoxificação do subproduto agroindustrial de tungue por *Paecilomyces variotii* / Leonardo Zanovello. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fermentação em estado sólido. 2. Fitase. 3. *Paecilomyces variotii*. 4. Resíduo agroindustrial. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em outro idioma: Phytase production and detoxification of agro-industrial byproduct of tung by *Paecilomyces variotii*

Palavras-chave em inglês:

Solid state fermentation

Phytase

Paecilomyces variotii

Agro-industrial waste

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Leila Picolli da Silva

Alexandre Nunes Ponezi

Data de defesa: 08-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Alves Macedo
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Leila Picolli da Silva
Membro Titular
Universidade Federal de Santa Maria

Dr. Alexandre Nunes Ponezi
Membro Titular
CPQBA/UNICAMP

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
Membro Suplente
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Membro Suplente
FEA/UNICAMP

Resumo

O Brasil é conhecido por ser um dos maiores produtores agroindustriais do mundo, o que reflete diretamente no crescimento econômico do país. Entretanto, toda essa produção tende a gerar alguns problemas de cunho ambiental como o acúmulo de resíduos e excedente de subprodutos. Uma solução para este problema, é a utilização deste material em processos biotecnológicos como a fermentação em estado sólido, que pode viabilizar a síntese microbiana de fitases, que são usualmente aplicadas como aditivos em ração animal.

Neste cenário, este trabalho foi conduzido com o objetivo de utilizar o subproduto agroindustrial da extração de óleo dos frutos de tungue (torta de tungue) para produção da enzima fitase, bem como verificar a degradação dos compostos tóxicos presentes nesse resíduo pela manipulação do fungo filamentoso *Paecilomyces variotii*. Por meio da técnica de planejamento experimental foi obtido um aumento do rendimento na produção da enzima de aproximadamente 2,5 vezes, apresentando atividade específica de 9,56 U/mg de proteína. Foram ainda avaliadas as características bioquímicas do extrato bruto enzimático, que demonstrou pH e temperatura ótimos em 5,0 e 37°C respectivamente. A enzima apresentou estabilidade em pHs alcalinos e em temperaturas acima dos 60°C. Também foi estudada a influência de sais e inibidores na atividade, com destaque para os íons Fe^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} , os quais afetaram negativamente a ação da fitase. Nos estudo da detoxificação dos ésteres de forbol, através das análises por cromatografia líquida de alta eficiência, em 48 horas de fermentação não foi detectada quantidade significativa do composto tóxico. Assim como na análise citotóxica por MTT (teste da atividade da desidrogenase mitocondrial) foi constatado crescimento celular semelhante ao controle após a utilização de coproduto fermentado por 72 horas, comprovando que o processo de detoxificação foi eficiente.

Abstract

Brazil is well known to have one of the biggest agro-industrial production in the world, which is direct reflected in the country's economic growth. However, the large yield of field usually come with some environmental issues like the accumulation of agro-industrial by-products. A promising solution for this problem is to reuse the residues in biotechnological processes as solid state fermentation (SSF), using microorganisms to synthesize phytases, that can be applied in animal feed.

The aim of this work was to use the agro-industrial residue from tung's fruit oil extraction, known as tung meal, for phytase production, as well as the biochemistry characterization of crude enzymatic extract and detoxification of phorbol ester presents in Tung meal structure by the fungus *Paecilomyces variotii*. Statistical approach of experimental design showed a 2,5-fold increase in phytase production yield, being that the specific activity of the enzyme was 9,56 U/mg. The biochemistry characteristics of phytase crude extract were optimum pH of 5,0 and optimum temperature of 37°C, besides the enzyme showed stability in alkaline pH and worked in temperatures over than 60°C. The effects caused by salt and phytase activity inhibitors, showed that Fe^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} decreased drastically the action of enzyme. The detoxification tests were performed by HPLC analysis, running samples with 48, 72, 96, 120 hours of fermentation, without any kind of treatment and only heat treatment. After 48 hours fermentation was not detected significant amount of toxic compound, as well as analysis by MTT cytotoxicity test (mitochondrial dehydrogenase activity), was observed the same cell growth as the control samples following the use of processed waste for 72 hours, proving that the detoxification process was efficient.

Sumário

1	Introdução Geral	1
2	Revisão bibliográfica	2
2.1	Fermentação em Estado Sólido (FES)	2
2.2	Fungo Filamentoso <i>Paecilomyces variotii</i>	4
2.3	Torta de Tungue	7
2.4	Ácido fítico e Fitase	10
2.5	Uso de fitase em alimentação animal	14
3	Objetivo	17
4	Material e métodos	18
4.1	Caracterização e preparo do substrato	18
4.2	Cultivo do Micro-organismo e Análises do Extrato Enzimático.	19
4.3	Otimização das condições de produção da Fitase.	21
4.4	Caracterização bioquímica da fitase produzida por <i>Paecilomyces variotii</i>	25
4.5	Detoxificação da torta de tungue	26
5	Resultados e Discussão	27
5.1	Caracterização e preparo da torta de tungue para fermentação	27
5.2	Experimentos preliminares à otimização da produção de fitase: cinética da reação enzimática e da fermentação.	29
5.3	Otimização da produção da fitase no substrato tungue	30
5.4	Caracterização bioquímica do extrato bruto de fitase.	42
5.5	Detoxificação da torta de tungue em FES por <i>Paecilomyces variotii</i>	52
6	Conclusões	58
7	Bibliografia	58

“Se você está tentando alcançar algo, haverá bloqueios. Eu os encontrei, todo mundo os encontrou. Mas obstáculos não podem te parar. Se você topar com uma parede, não vire e desista. Descubra como escalá-la, passe por ela, trabalhe nisso.”

Michael Jordan

AGRADECIMENTOS

À Professora Gabriela pela oportunidade e todos os ensinamentos. Ainda pela amizade, dedicação e compreensão durante toda essa jornada.

Aos meus Pais Luiz e Célia, por todo apoio, motivação e amor que sempre demonstraram em todos os momentos de minha vida.

Aos meu Padrinhos Carlos e Sônia que, como meus segundos pais, sempre me apoiaram e motivaram com todo o carinho.

Aos Professores da banca examinadora pela contribuição ao meu trabalho.

À Professora Dra. Leila Picolli da Silva pelo conhecimento e ensinamento.

Ao Dr. Alexandre Nunes Ponezi pelo conhecimento e ensinamento.

À todo o pessoal do laboratório de Bioquímica pela amizade e companheirismo e por aguentar minhas cantorias sertanejas durante esses 2 maravilhosos anos. Em especial para meu amigo José Valdo que me ensinou e aconselhou sempre que precisei de ajuda.

À todas as pessoas que conheci na Faculdade de Engenharia de Alimentos: colegas e funcionários.

Ao pessoal do Laboratório de Piscicultura/Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria e das Indústrias de Óleo Varela LTDA pela contribuição e fornecimento da torta de tungue.

Ao pessoal da USF(Universidade São Francisco - Bragança Paulista) por disponibilizar seus recursos para realização de parte dos experimentos.

Aos meus queridos amigos que compartilharam de todos os momentos desta caminhada.

À minha namorada Jo que entrou em minha vida em um dos momentos mais importantes de minha vida.

À CNPQ pela concessão da bolsa.

Á todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Índice de Tabelas

Tabela 1 : Concentração dos nutrientes utilizados no planejamento fatorial fracionado.	22
Tabela 2: Matriz codificada do delineamento fatorial fracionado 25-1.	23
Tabela 3: Níveis do fatorial completo 2^3 para otimização das variáveis físicas da otimização.....	24
Tabela 4: Matriz codificada para o DCCR completo 2^3	24
Tabela 5: Caracterização da torta de tungue em relação ao pH, umidade e granulometria.	28
Tabela 6: Caracterização da torta de tungue em relação ao pH, umidade e granulometria.	28
Tabela 7: Matriz codificada e valores reais do planejamento fracionado 52-1 mais 3 repetições no ponto central e atividade enzimática obtida experimentalmente.....	32
Tabela 8: Matriz codificada e valores reais do planejamento fracionado 52-1 mais 3 repetições no ponto central e atividade enzimática obtida experimentalmente.....	32
Tabela 9: Matriz codificada, valores reais e atividade enzimática dos experimentos....	34
Tabela 10: Coeficientes de regressão e efeitos dos indutores da síntese de fitase.	35
Tabela 11: ANOVA do modelo predito para a produção de fitase.	36
Tabela 12: Respostas experimentais versus preditas pelo modelo.	37
Tabela 13: Repetição da fermentação no ponto(condição) otimizado de produção enzimática e atividade específica da fitase.	38
Tabela 14: Matriz codificada e valores reais com atividade enzimática de cada ensaio realizado.....	40
Tabela 15: Coeficientes de regressão e efeitos para resposta de atividade enzimática. .	41
Tabela 16: Efeitos de sais e inibidores na atividade da fitase de <i>Paecilomyces variotii</i> .	51
Tabela 17: Concentração de éster de forbol na torta de tungue antes e após fermentação em estado sólido.	53

Índice de Figuras

Figura 1: Árvore filogenética das espécies de <i>Paecilomyces</i> .	5
Figura 2: Fungo <i>Paecilomyces variotii</i> aumentado 1000 vezes.	6
Figura 3: Árvore de tungue e seus frutos. Fonte: Embrapa	7
Figura 4: Estrutura do tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) adaptado de (Evans 1986).	9
Figura 5: Estrutura química do Ácido Fítico (Raboy, 2003).	11
Figura 6: Hidrólise do Ácido Fítico pelas enzimas 3-fitase e 6-fitase (Dvoráková, 1998).	12
Figura 7: <i>Paecilomyces variotii</i> em tubos de ensaio sem e com vaselina.	19
Figura 8: Cinética da atividade enzimática da fitase de <i>Paecilomyces variotii</i> .	29
Figura 9: Cinética de fermentação para produção de fitase de <i>P. variotii</i> .	30
Figura 10: Superfície de resposta para otimização da produção da fitase.	36
Figura 11: pH ótimo de atividade da fitase de <i>P. variotii</i> .	43
Figura 12: Comparação entre pH ótimo de atividade da fitase de <i>P. variotii</i> e das fitases comerciais de <i>A. niger</i> e <i>E.coli</i> .	44
Figura 13: pH de estabilidade para atividade da fitase de <i>P. variotii</i> .	45
Figura 14: Comparação entre pH de estabilidade de atividade da fitase de <i>P. variotii</i> e das fitases comerciais de <i>A. niger</i> e <i>E.coli</i> .	46
Figura 15: Temperatura ótima de atividade da fitase de <i>P. variotii</i> .	47
Figura 16: Comparação entre temperatura de ótima de atividade da fitase de <i>P. variotii</i> e das fitases comerciais de <i>A. niger</i> e <i>E.coli</i> .	48
Figura 17: Temperatura de estabilidade de atividade da fitase de <i>P. variotii</i> .	50
Figura 18: Comparação entre temperatura de estabilidade de atividade da fitase de <i>P. variotii</i> e das fitases comerciais de <i>A. niger</i> e <i>E.coli</i> .	50
Figura 19: Cromatograma da corrida em cromatografia líquida de alta eficiência do padrão Forbol-12-Miristato-13-Acetato (a) e seu espectro de detecção (b).	54
Figura 20: Cromatograma de análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos ésteres de forbol das amostras não fermentada (a), não fermentada autoclavada (b) e 48 horas (c) de fermentação.	55
Figura 21: Crescimento celular em relação à concentração de forbol referente as amostras não fermentadas(NF e NFA) e fermentadas(48 e 72 horas).	57

1 Introdução Geral

A classe de vegetais composta por cereais, leguminosas e oleaginosas são a base da alimentação para grande maioria dos animais, incluindo o homem. O Brasil é considerado um dos maiores fornecedores dessas matérias-primas no mundo, com avaliação da safra nacional até agosto de 2012 estimada em 164,5 milhões de toneladas (IBGE, 2012). Apesar desta vasta disponibilidade de nutrientes, sabe-se que existem obstáculos quando o assunto é a elaboração de alimentos a base de vegetais, sejam eles para consumo animal ou humano. Um dos maiores problemas neste contexto é a presença de fatores antinutricionais como os fitatos, os quais podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento desses indivíduos.

O fitato, também conhecido como ácido fítico (mio-inositol hexafosfato) é a principal reserva de fósforo em grãos, sementes oleaginosas e leguminosas (Pandey et al., 2001). Devido a sua estrutura química, estes compostos apresentam grande estabilidade molecular, tornando o fósforo indisponível para maioria dos animais, principalmente os monogástricos, por não possuírem as enzimas necessárias para degradação do fitato. Em consequência, o ácido fítico atua como componente antinutricional, pois pode quelar minerais essenciais e se ligar a aminoácidos proteínas e enzimas digestivas (Pallauf and Rimbach, 1996).

Uma tecnologia viável para melhorar a disponibilidade nutricional de rações é a utilização de enzimas exógenas como aditivos (Pariza, 2010). As fitases (E.C.3.1.3.8 e E.C.3.1.3.26) são inositol hexafosfato fosfohidrolases que catalisam passo a passo a defosforilação do ácido fítico (IP_6), resultando na formação de mio-inositol ésteres menos fosforilados e fósforo inorgânico (Lei, 2003). Embora estas enzimas possam ser encontradas naturalmente em plantas e em alguns tecidos animais, os micro-organismos são as fontes mais promissoras para sua obtenção, por meio de processos biotecnológicos como fermentação em estado sólido (FES).

A FES aparece neste contexto como um processo promissor para a produção de enzimas utilizando resíduos da agroindústria como substratos abundantes e de baixo custo, além de ser sustentável e não prejudicial ao meio ambiente (Pandey, 2003).

Outra aplicação para a FES é a degradação de compostos indesejados que alguns coprodutos do processamento de agroindústrias possuem. O resíduo gerado pela etapa de extração de óleo do tungue para a produção de biodiesel possui ésteres de forbol que são tóxicos para animais e humanos. Por FES desse material, o fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* pôde utilizar tais moléculas para seu desenvolvimento detoxificando o substrato em questão. Dessa forma, a FES constitui uma maneira de reduzir o custo de produção e viabilizar o uso da enzima fitase, simultaneamente ao interesse em estudar a utilização de subprodutos agroindustriais fermentados como possível ingrediente na ração animal (Madeira,2010).

A partir da coleção de micro-organismos pertencente ao Laboratório de Bioquímica de alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos –UNICAMP, foi realizado, dentre 400 linhagens fúngicas, um screening para produtores da enzima tanase. Em 2005, Macedo e colaboradores isolaram o fungo *Paecilomyces variotii* como melhor produtor da mesma. Cinco anos mais tarde, Madeira (2010) testou a mesma linhagem para síntese de fitase obtendo resultados positivos, que impulsionaram novos estudos para entender melhor o potencial desse micro-organismo.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)

O processo de fermentação em estado sólido visa recriar o ambiente natural dos micro-organismos, com o objetivo de fornecer as condições necessárias para seu desenvolvimento, disponibilizando a maior quantidade dos nutrientes essenciais para o seu crescimento (Singhania, 2009). Este bioprocessos se caracteriza principalmente pela ausência de água livre no meio de fermentação, contudo, faz-se necessário uma hidratação mínima do substrato para crescimento do micro-organismo, sendo que os meios sólidos não devem ser hidrossolúveis (Pandey, 2003).

Durante um longo período, a FES foi pouco estudada em detrimento à fermentação submersa (FS), a qual apresentava processos industriais bem sucedidos, como o exemplo da

produção da penicilina. Contudo, nos últimos anos, as pesquisas em FES tornaram-se cada vez mais importantes, com grande número de artigos publicados, registros de patentes e aplicações em diversas áreas industriais (Pandey, 2003).

A grande diferença entre fermentação em estado sólido e a fermentação submersa, como o próprio nome diz, está na quantidade de água presente em cada meio. Em FES, a ausência de água livre é um dos pré-requisitos indispensáveis, além de que a parcela sólida pode representar até 70% da massa total do processo. Por outro lado, em cultivo submerso, as partículas sólidas ou nutrientes estão, em sua maior parte, dispersas no meio líquido (Mitchell, 1992).

Podem ser realizadas comparações entre os tipos de fermentação de acordo com vários parâmetros. Bioprocessos como fermentações submersas são muito exigentes quando se tratam de questões como a esterilidade do processo, pois caso ocorra contaminações nos procedimentos, toda a operação será afetada. Em contrapartida, quando se utiliza FES, dificilmente ocorrerá contaminação que possa competir com o inóculo ativo durante o processo fermentativo, não causando ações prejudiciais para o desenvolvimento do micro-organismo e a consequente produção de metabólitos de interesse (Pandey, 2000). Fato este importante, pois é possível utilizar equipamentos não tão sofisticados e com menor controle operacional, tendendo a reduzir o grau de tecnologia empregado e consequentemente os custos do processo. Outra vantagem da FES é a possibilidade de utilizar suportes simples, geralmente de origem vegetal, e com pouca, ou nenhuma necessidade de suplementação nutricional, tendendo fazer com que o processo seja ainda mais acessível financeiramente (Pandey, 2003).

Um aspecto relevante para se trabalhar com FES é a escolha de um substrato de interesse para o processo em desenvolvimento. Portanto, além de beneficiar o micro-organismo, a matéria-prima deve possuir vantagens de custo e de disponibilidade de acesso, tornando os resíduos agroindustriais uma alternativa promissora para tal aplicação (Pandey, 2000).

Muitos substratos sólidos já foram testados para FES, sendo a maioria deles provenientes de resíduos agroindustriais. Vários desses resíduos como bagaços de cana-de-açúcar e de mandioca, casca de café, torta residual da soja entre outros, podem ser processados biotecnologicamente. Se utilizados dessa maneira podem contribuir para a

produção de metabólitos de alto valor agregado, por exemplo: enzimas, aminoácidos ácidos orgânicos e biocombustíveis. Além disso, a utilização desses materiais vem a ser uma alternativa para o tratamento destes resíduos industriais, pois durante esse tipo de bioprocessos tais coprodutos podem ser biotransformados em compostos de interesse comercial e/ou industrial, ou até mesmo detoxificados, em caso da presença de componentes tóxicos na matéria-prima (Pandey A, Soccol CR, 1998; Pandey A, Soccol CR, 2000; Soccol CR, Krieger N, 1998).

Em relação a fermentação submersa a fermentação em estado sólido tem demonstrado maior produção de enzimas por grama de substrato, maior concentração de produtos finais, maior estabilidade dos produtos, menor repressão catabólica, cultivo de fungos em substratos insolúveis em água (utilização de resíduos) e menor demanda de esterilidade pela baixa atividade de água presente nos procedimentos (Hölker, 2004). Em estudo de comparação entre FES e FS para produção das enzimas invertase, tanase e pectinase foi observada superioridade do primeiro pela constatação da maior produção de biomassa, maior concentração final dessas enzimas e menor degradação de proteínas (Viniegra-González G, 2003). Além disso, em alguns casos, micro-organismos podem utilizar e reduzir compostos indesejados presentes em certos resíduos durante o seu desenvolvimento (Reddy and Pierson, 1994). Sun et al. (2008) demonstrou a redução de 78% de gossypol em torta de semente de algodão fermentado por *Geotrichum candidum*.

2.2 Fungo Filamentoso *Paecilomyces variotii*.

Estudado pela primeira vez por Bainier (1907), linhagens do fungo filamentoso *Paecilomyces variotii* são encontradas em vários nichos, incluindo alimentos, solo, ar e substratos ligno-celulósicos (Houbraken, 2010), demonstrando sua alta capacidade de adaptação e suas propriedades termófilas (Samsom, 1974).

O fungo está classificado no filo Ascomycota, da classe dos Ascomycetes, ordem dos Eurotiales e família dos Trichocomaceae (Figura 1). O gênero *Paecilomyces* contém várias espécies, sendo *Paecilomyces lilacinus* e *Paecilomyces variotii* as mais comuns. Essas diversas espécies podem ser diferenciadas pela cor da colônia e por propriedades microscópicas distintas. Outra característica peculiar é a capacidade de crescer em altas

temperaturas que algumas dessas espécies possuem. Como exemplo, a espécie *P. variotii* (Figura 2) pode crescer em temperaturas de até 60°C (Hoog, G. S. et al. 2000).

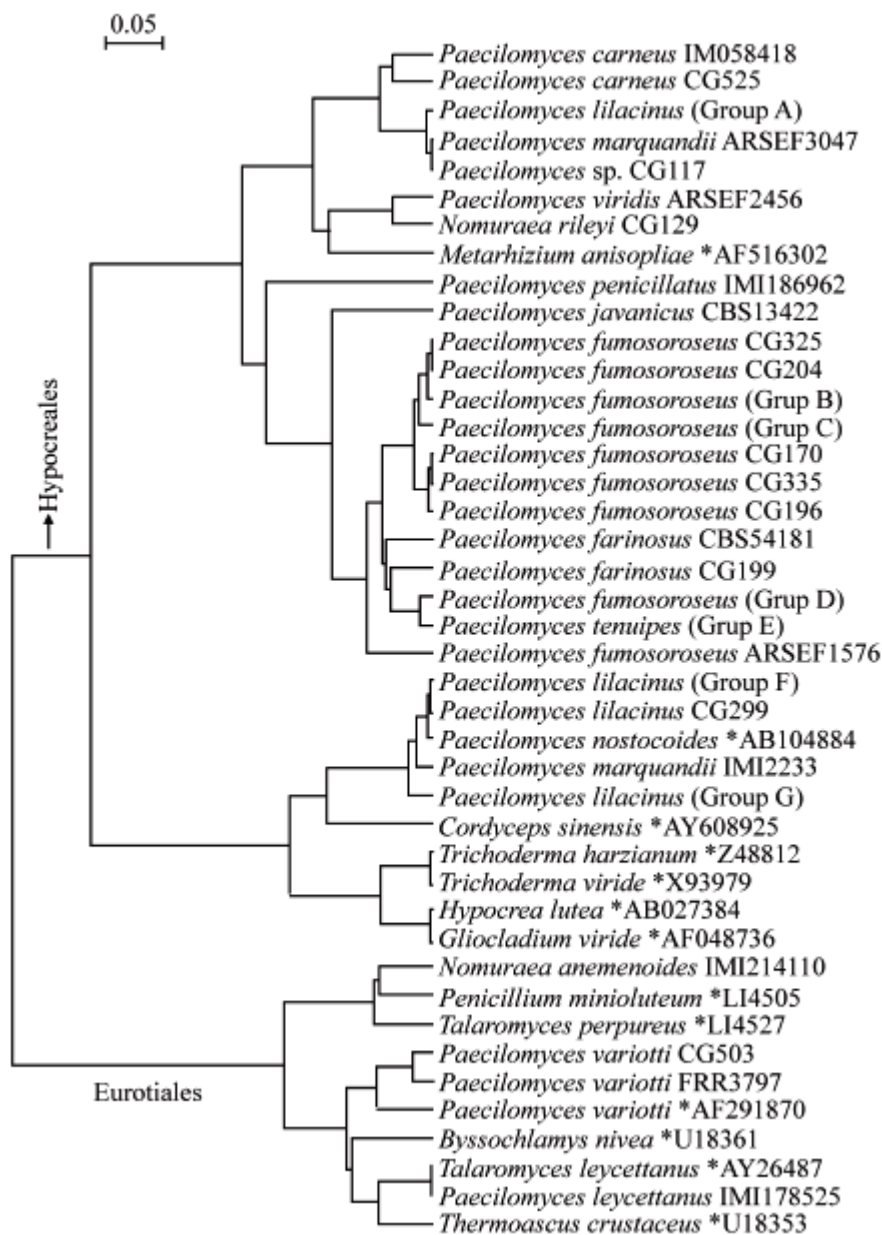


Figura 1: Árvore filogenética das espécies de *Paecilomyces*.

Fonte: Inglis, P.W.(2005).



Figura 2: Fungo *Paecilomyces variotii* aumentado 1000 vezes.

Fonte: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue2/full/9/f1.html>

Assim como algumas cepas do fungo demonstram propriedades saprófitas podendo ser patogênicas para homens e animais (Baker, 1971), existem na literatura, informações de que algumas linhagens de *Paecilomyces variotii* distinguem-se por serem parasitas nematóides. Como estudado por Nguyen (2008), em que o fungo isolado *Paecilomyces variotii* DG-3 demonstrou determinada habilidade em relação ao nematóide das galhas.

Desde suas primeiras aparições na literatura essa espécie apresentou-se como produtor de metabólitos como ácidos orgânicos, antibióticos e antifúngicos (Shaposhnikov and Manteifel, 1923; Loesecke, 1945; Sakaguchi et al. 193; Takeuchi et al. 1959; Dieckmann, 1967; Voinova-Raikova et al., 1969). Com o passar dos anos e a melhoria das condições tecnológicas, novos produtos tem sido estudados frente ao cultivo das várias linhagens de *P. variotii*, sendo a síntese de proteínas um dos mais valorizados atualmente. Almeida e Silva, J.B. et al.(1995) obtiveram com sucesso uma proteína composta com todos aminoácidos essenciais para alimentação animal utilizando a espécie aqui abordada. Battestin (2007) constatou a produção da enzima tanase através do processo de fermentação em estado sólido com linhagem de *P. variotii*, a qual também apresentou dados positivos para a síntese de fosfatases em condições similares (Madeira, 2011). Outra propriedade da espécie é a habilidade de promover biodeterioração em diferentes compostos como o óleo de palma,

cosméticos e emulsões farmacêuticas (Navarre and Baley, 1957; Coursey, 1959; Eggins and Walker, 1963; Cornelis et al. 1965;). Recentemente, Madeira(2011) observou a detoxificação da torta de mamona pela degradação da proteína ricina utilizando *P. variotii* em FES.

2.3 Torta de Tungue

Tungue é o nome comum utilizado para designar duas espécies pertencentes à família das *Euphorbiaceae*, denominadas cientificamente *Aleurites fordii* e *A. Montana*. A espécie *A. fordii* (Figura 3) é de origem asiática com cultivo predominante na China, apresentando forte disseminação pela América do Sul, África e Estados Unidos devido às ricas propriedades do óleo extraído de suas amêndoas. No Brasil foi introduzida no início do século XX, sendo encontrada principalmente no Rio Grande do Sul nos municípios da Serra Gaúcha (GRUSZYNSKI et al., 2003).



Figura 3: Árvore de tungue e seus frutos. Fonte: Embrapa

O fruto do tungue possui amêndoas constituídas de aproximadamente 40% de óleo (Duke, 1983), composto por 75-80% de ácido alfa-esteárico, 15% oleico, 4% palmítico e 1% esteárico. A alta concentração de ácido α -esteárico atribui ao óleo de tungue propriedade de secagem rápida, atribuindo-o qualidade superior nesta peculiaridade tecnológica (Sonntag, 1979). Por isso, é muito utilizado na formulação de resinas, tintas, corantes e revestimentos (Dyer, 2004). Além disso, com o aumento da busca por novas fontes de energia verdes e o consequente desenvolvimento da produção de biodiesel, vegetais com grandes quantidades de óleo são cada vez mais valorizados.

Por esses motivos e pelas peculiaridades de seu cultivo, que não exige solos de alta qualidade, possui produtividade de média safra e ser considerada uma planta perene. O tungue não compete com espécies consolidadas na agroindústria como a soja, algodão, girassol, canola, entre outras, e sim se apresenta, como mais uma proposta de diversificação na disponibilidade de matérias-primas nesta área (Pretto, 2013).

Estudos de conversão do óleo de tungue em biocombustível indicam rendimentos próximos a 90% (Kautz et al, 2008). Dessa maneira, esta espécie pode ser uma alternativa de grande potencial para o sul do Brasil por ser oriunda de clima temperado, sendo adaptado as condições edafoclimáticas desta região.

O processo de extração de óleo das sementes de tungue gera um resíduo denominado torta. Este subproduto de alto valor nutricional é composto por 25% de proteínas, 23% fibras, 25% lipídios, 15 % carboidratos e 9% de água. Entretanto, é tóxico para animais, o que desvia seu uso apenas para fertilização do solo (Vaughan, 1970; Schneider, 2011). Em análises químicas por ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massa, definiu-se o composto Forbol-12-Miristato-13-Acetato o qual foi o precursor das propriedades tóxicas (Okuda, 1975).

Ésteres de forbol são diterpenóides tetracíclicos conhecidos geralmente pela sua capacidade de promover atividade tumoral (G. Goel et al., 2007), sendo naturalmente encontrados em várias plantas da família das Euphorbiaceae, como no tungue e o pinhão manso (*Jatropha curcas*), por exemplo. Estudos relatam que esses compostos podem causar em vertebrados, incluindo humanos, queimaduras na boca e garganta, vômitos, aumento da pressão, indução de tumores, entre outros malefícios (Blumberg, 1988). A estrutura dos forbóis são dependentes da cadeia principal formada por um diterpeno tetracíclico

conhecido como tigliano. Existem dois isômeros de ésteres de forbol, sendo um deles (α) inativo e outro (β) ativo diferenciados pelos grupos hidroxilas presentes no terceiro anel (anel C) do conjunto (figura 4) (G. Goel et al., 2007). Os beta-forbóis são capazes de interagir com enzimas do metabolismo causando problemas para o organismo, ao interferir no mecanismo de crescimento e diferenciação celular (Silinsky and Searl 2003).

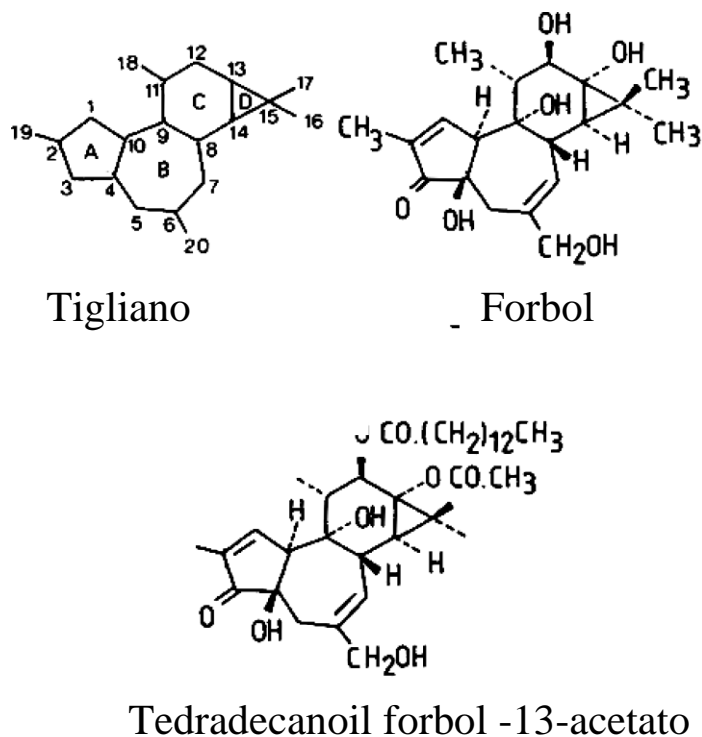


Figura 4: Estrutura do tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) adaptado de (Evans 1986).

Por sua alta toxicidade, a torta de tungue possui baixo valor agregado e por isso é muito pouco utilizada. Até mesmo seu aproveitamento como fertilizante pode ser inapropriado, uma vez que haveria acúmulo de substâncias tóxicas no solo, tornando-se um problema ambiental. Assim, a remoção de ésteres de forbol aparece como um importante desafio a ser estudado (C. Joshi et al, 2011), além do que, seria possível a conversão de um produto de baixo custo, em alimento animal de alto valor (G.E.Mann, 1954). Diversos processos já foram testados para remoção de ésteres de forbol. Makkar et al. (2009) demonstraram a degradação completa destes compostos através de tratamento físico sob altas condições de temperatura e pressão. Entretanto, sabe-se por informações descritas na literatura, que somente o tratamento térmico não é eficiente para a remoção dos

ésteres, sendo necessário outros passos envolvendo tratamentos químicos para aumento da eficiência, tornando o processo caro e nem sempre efetivo (Aregheore *et al.*, 2003). Assim é evidente que os estudos para remoção de ésteres de forbol devem continuar evoluindo, preferencialmente optando por alternativas sustentáveis, de maneira a diminuir cada vez mais os conflitos com o meio ambiente.

Uma possibilidade para a detoxificação da torta de tungue é o processo biotecnológico de fermentação em estado sólido. Durante o seu desenvolvimento, micro-organismos como fungos e bactérias podem reduzir os compostos tóxicos presentes em determinados substratos. Em 2011, C. Joshi *et al.*, observou a completa degradação de ésteres de forbol por *Pseudomonas aeruginosa* em torta de pinhão manso durante 9 dias de fermentação em estado sólido. Em resíduo torta de mamona, após 48 h de FES utilizando o fungo *Paecilomyces variotii* foi observado o desaparecimento das bandas de ricina observadas anteriormente nas análises por eletroforese SDS-PAGE (Madeira *et al.*, 2011).

2.4 Ácido fítico e Fitase

O mio-inositol ou ciclicol é um derivado cíclico da glicose (Loewus and Murthy, 2000) abundante na natureza, principalmente nas vias metabólicas de vegetais, em que exerce importante papel na disponibilização de fósforo e reserva de energia (Raboy, 2003). Apesar de haver várias formas de mio-inositol fosforilados, a mais encontrada e de maior relevância é a mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato (figura 5), denominado também ácido fítico ou fitato (Cosgrove 1980, Raboy 1997).

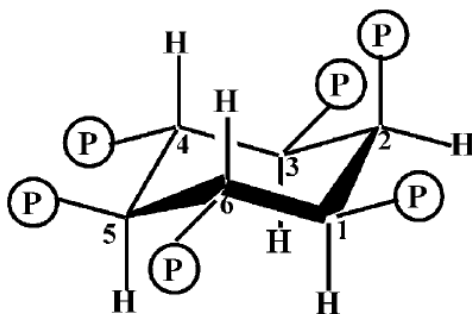


Figura 5: Estrutura química do Ácido Fítico (Raboy, 2003).

A grande maioria do fósforo de fontes vegetais encontra-se na forma orgânica de fitato, o que corresponde em 1-5% da massa de cereais, legumes, castanhas e sementes oleaginosas. Apenas um terço do fósforo está disponível na forma inorgânica e, portanto, passível de ser utilizado por organismos monogástricos, pois estes não possuem as enzimas específicas para liberar esse mineral que compõe as moléculas de ácido fítico (Vats, 2004). Além disso, os mio-inositóis hexakisfosfato são conhecidos por se apresentar como agente antinutricional, o qual pode se complexar com minerais, formando compostos insolúveis e menos suscetíveis a absorção do organismo (Davies 1982, Reddy et al., 1989), podendo ainda se ligar a aminoácidos, lipídios e enzimas digestivas, de forma a afetar suas funções.

Mesmo com a grande quantidade de fósforo orgânico presente em cereais e sementes, a realidade é que a grande maioria desse composto está biologicamente indisponível. Logo, uma das práticas mais utilizadas para a suplementação de rações para aves, peixes e suínos é a adição de fósforo inorgânico, um material não renovável e de alto valor, além de ajudar no aumento da excreção de fitato para o meio ambiente, podendo desenvolver problemas ambientais (Lei, 2003). Em alguns países como Alemanha e Holanda, existem leis que determinam a necessidade em diminuir a poluição por fósforo proveniente da criação intensiva desses animais (Wodzinski and Ullah, 1996).

As fitases, denominadas sistematicamente como mio-inositol-hexaquisfosfato fosfohidrolases são enzimas responsáveis pela ruptura da ligação entre os fósforos presentes nas moléculas de ácido fítico (IP_6), transformando (figura 6) essa molécula em mio-inositóis desfosforilados (IP_5 - IP_1) e fósforo inorgânico (Lei, 2003). Essas enzimas definidas como histidina ácido fosfatases (Histidine Acid Phosphatases – HAPs) estão dispostas em um subgrupo das fosfatases (Vats, 2004). Contudo, a maneira mais usual utilizada para relacionar esta classe é definida pelo Comitê Internacional de Nomenclatura de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, o qual é baseado na posição do primeiro fosfato liberado pela fitase (Kerovuo, 2000). Assim as enzimas são descritas como 3-fitase (E.C.3.1.3.8) e 6-fitase (E.C.3.1.3.26), as quais são geralmente predominantes em micro-organismos e vegetais respectivamente.

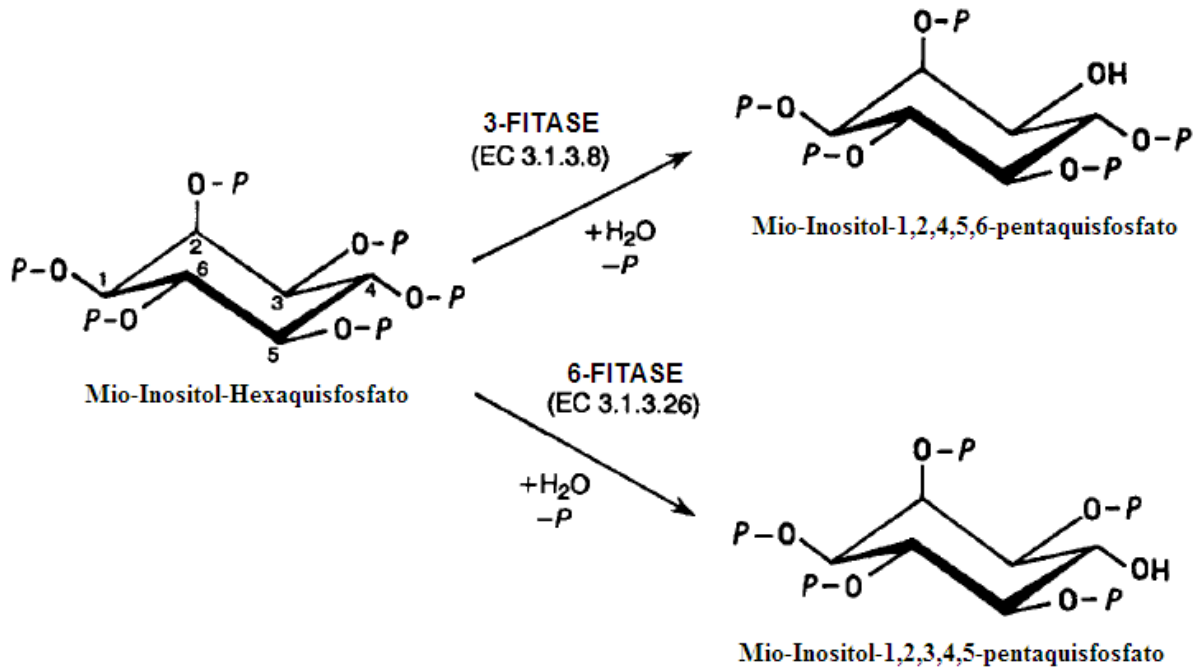


Figura 6: Hidrólise do Ácido Fítico pelas enzimas 3-fitase e 6-fitase (Dvoráková, 1998).

Nos últimos anos, os trabalhos sobre fitase cresceram substancialmente, devido ao grande interesse em melhorar nutricionalmente rações animais e até mesmo alimentos para humanos reduzindo a porção de ácido fóico em sua composição (Greiner, 1997). A ação dessas enzimas formam ésteres inositolis com menor grau de fosforilação (IP₅-IP₁), que podem agir como mensageiros celulares secundários e, em alguns casos, demonstram efeitos farmacológicos como diminuição do colesterol e triglicérides, ação antitumoral e tratamento de doenças como Parkinson's e Alzheimer's (Potter 1990; Bezprozvanny 1991; Ivorra 1991; R. Greiner, *et al*, 2000). No entanto, com a alta demanda da indústria de alimentação animal, que prevê um crescimento anual em torno de 10% ao ano desde 2006, com movimentação financeira anual de mais de UU\$ 10 bilhões, é nítida a manutenção de um longo caminho para o desenvolvimento de pesquisas em torno das fitases nesse segmento (Boletim Sindirações, 2007).

As fitases quando utilizadas como aditivo para rações animais promovem o aumento da biodisponibilidade de fósforo, favorecendo principalmente animais não ruminantes e,

consequentemente diminuindo a poluição do solo pelo fósforo não aproveitado pelo organismo. Além disso, a lise do fitato ocasionada pela enzima evita que tal composto atue no metabolismo como quelante de íons metálicos, lipídeos, ligação de proteínas e carboidratos, com isso aumentando sua nutrição na ração (Vats, 2004).

A importância das pesquisas para produção de fitase tem apresentado maiores proporções não somente pela busca de novas fontes desta enzima como pela tentativa de encontrar variações com características desejáveis para indústria de alimentação, principalmente animal, relacionadas à termoestabilidade, à estabilidade em baixo pH e ao custo do processo fermentativo (Madeira, 2010).

Diversos micro-organismos foram descritos como sintetizadores de fitase. Trabalhos como de Shimizu (1992) e Greiner et al. (1993), sugerem a produção desta enzima utilizando linhagens de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Já entre as leveduras, as do gênero *Saccharomyces* ganham certo destaque (Dvoráková, 1998; Ries, 2009). No entanto, a melhor fonte de fitase microbiana descrita na literatura é a de fungos, principalmente os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor* (Madeira, 2010).

Em recente trabalho conduzido por Gosh *et al* (2011), foi descrita a produção de fitase utilizando torta de linhaça como um novo substrato. Nesse caso, foi utilizada uma cepa do fungo *Rhizopus oryzae* para a produção da enzima, utilizando os métodos Plackett–Burman design (PBD) e posteriormente delineamento central composto rotacional (DCCR) para otimização do meio fermentação sólida. Os resultados demonstraram a síntese de uma fitase termoestável, resistente a proteólise e a metais pesados.

Em pesquisa realizada com resíduos de mandioca, com adição de fonte de nitrogênio para fermentação em estado sólido, foi utilizado o fungo filamentoso *Aspergillus niger* para produção de fitase. Nesse trabalho foi observado rendimento máximo da enzima de 6,73 UA/g de matéria seca. Além disso, apresentou atividade residual de 4,71 UA/g à 75°C durante 30 minutos, que suportaria em processamentos na indústria de ração (Hong, 2001).

Madeira et al. (2011), submeteram o fungo *Paecilomyces variotii* à fermentação sólida com substrato de torta de mamona, visando a simultânea produção de fitase e detoxificação do resíduo. Os resultados demonstraram que o micro-organismo foi capaz de sintetizar as fosfatases com atividade de até 260 UA/g de matéria seca após 72 horas de fermentação.

2.5 Uso de fitase em alimentação animal

O Brasil possui uma das maiores economias do mundo, e um dos setores mais importantes e que mais contribui para esse fato é o agroindustrial. A produção de diversos cereais, sementes oleaginosas, cana-de-açúcar, frutas, entre outros, além da porção agropecuária contribui em alto nível para o desenvolvimento do PIB brasileiro. Segundo dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (IBGE, 2011), somente a parcela referente à safra de grãos em 2011 foi de 159,9 milhões de toneladas, quantidade essa que ultrapassa em mais de 6% a produção recorde em 2010. Como efeito dessa alta produtividade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento calcula que as exportações no setor ultrapassam os 90 bilhões de dólares.

Por integrar a mesma cadeia de produção de carnes, a indústria brasileira de alimentação animal tem sido impulsionada pelos sucessivos ganhos em escala, além de constituir-se elo essencial ao suprimento da alimentação segura, interligando o campo a mesa, ou seja, o produtor rural ao consumidor final. Nesse contexto, a alta demanda de rações tem refletido no aumento constante da produção deste material, assim como os aditivos necessários para sua suplementação. Em 2007 esse mercado gerou renda acima de U\$ 12 bilhões para a produção de rações e mais de U\$ 800 milhões para os aditivos (Sindirações, 2008).

Principalmente após surtos de encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca) por todo o mundo durante os últimos anos e sua relação com o tipo de dieta de animais, a utilização de material proveniente de vegetais para produção de rações obteve larga expansão (Sá, 2005). Dessa forma, a composição padrão da produção de alimentos para animais, principalmente monogástricos, têm como principais ingredientes o farelo de soja e o milho, os quais contribuem para o aumento do custo dessas rações. Assim, com a variação constante do valor desses produtos, há um aumento do incentivo pela busca de alimentos alternativos tais como os subprodutos agroindustriais (Grangeiro et al., 2001).

Os meios agrícola e agroindustrial produzem milhares de toneladas de resíduos, os quais na maioria das vezes não são aproveitados, o que causa grandes problemas tanto para a agroindústria quanto para o meio ambiente (Graminha, 2008). Contudo, essa realidade pode ser reestruturada, pois, na maioria das vezes, esses subprodutos apresentam grande

potencial nutricional e portanto, diversas possibilidades para aplicação. Uma pequena parcela desses materiais pode ser aplicada diretamente para alimentação animal, enquanto que a maior parte necessita de tratamentos adequados para evitar que fatores antinutricionais prejudiquem seu metabolismo e consequentemente seu desenvolvimento. Outra abordagem, pode ser o aproveitamento com ferramentas biotecnológicas. Este bioprocessos pode utilizar resíduos agroindustriais para crescimento microbiano, o que pode aumentar a disponibilidade de fatores nutricionais e ao mesmo tempo produzir compostos de alto valor como enzimas. (Goel, 2005; Cao, 2007; Kuhad, 1997).

De modo geral, rações são definidas como qualquer material de origem natural, seja ele elaborado com suplementos ou não, mas com a capacidade de oferecer os nutrientes necessários para um determinado metabolismo. Sua qualidade depende de fatores como reservas de energia, quantidades adequadas de fibras e aminoácidos essenciais (González-Martín, 2006).

Introduzir subprodutos agroindustriais como alimento para animais pode trazer alguns benefícios ao seu desenvolvimento, como descrito no trabalho de Vasta (2008) o qual avaliou a qualidade da carne e do leite em pequenos ruminantes, constatando a melhora da produtividade em ambos os casos. Entretanto, é necessário tomar cuidado no emprego desses materiais para tais fins, evitando que os componentes antinutricionais de alguns resíduos, como o fitato, por exemplo, não interfiram negativamente na saúde dos animais. Os diversos componentes antinutricionais presentes nos mais diferentes resíduos podem causar mudanças na estrutura e composição dos ácidos graxos do leite e também da carne (Hervás, 2003).

Com o objetivo de excluir fontes nutricionais de origem animal, algumas rações formuladas com farelo de soja são interessantes fontes alternativas de nutrientes para peixes (Carter, 2000). Árnason (2009), demonstrou que o salmão (*Hippoglossus hippoglossus* L), precisa de concentração mínima de 35% de proteínas para o seu desenvolvimento ideal. Considerando a alta concentração proteica em agro resíduos como o tungue, por exemplo, seria possível a formulação de rações sem a adição de suplementos, com alto poder nutritivo e menor custo. Além disso, um estudo mostrou a comparação entre fontes tradicionais (com nutrientes de origem animal) e alternativas (basicamente origem vegetal) de alimentos para peixes, em relação a poluição causada no ambiente aquático. Os dados

mostraram a diminuição de compostos poluentes nas culturas quando utilizados os componentes alternativos (Berntssen, 2009).

A utilização de enzimas em diversos processos industriais ganha espaço a cada dia no cenário mundial, sempre buscando melhorar a eficiência e custo benefício de vários produtos, nas mais diversificadas áreas. Considerando, assim, que esses aditivos promovem melhor rendimento e efetividade com seus mecanismos de reação, economizando, portanto, em toda a cadeia de produção (Kirk, 2002).

Empregar enzimas no processamento de alimentos é um fato bem conhecido industrialmente. A suplementação com esses aditivos pode aumentar a funcionalidade dos nutrientes presentes nos ingredientes das rações permitindo melhor aproveitamento desses no organismo. No entanto, utilizar enzimas exógenas para a formulação dessas dietas exigem cuidados que garantam a eficiência e ação desejada pelas mesmas. A xilanase e a beta-glucanase, por exemplo, são aditivos para cereais que ajudam na digestibilidade dos nutrientes em animais monogástricos, os quais, possuem baixa capacidade para hidrolisar alguns componentes em alimentos de origem vegetal, tais como celulose, hemicelulose e o fitato (Polizeli, 2005; Remus, 2008).

A capacidade das enzimas em ultrapassar barreiras presentes no metabolismo (pH, temperatura, enzimas digestivas), tipo de substrato utilizado na ração, dosagem correta de acordo com o tipo de componente da ração, além do efeito nas diferentes espécies em que atuará, são alguns fatores importantes a serem considerados na utilização desses catalisadores (Alvarenga et al., 2008).

Atakora et al. (2010) descreveram a utilização das enzimas fitase e xilanase, em conjunto ou não, na dieta de suínos, analisando os efeitos metabólicos de produção de gases, desenvolvimento do animal, disponibilidade energética e de nutrientes. Os resultados mostraram que a diminuição de proteína bruta e fósforo inorgânico com adição das enzimas e aminoácidos sintéticos na dieta, foram efetivos na otimização do uso da energia disponível, diminuição da excreção de nutrientes como o fósforo e diminuição da produção de gases, mantendo o nível de desenvolvimento dos suínos.

Com o intuito de diminuir ou até mesmo excluir a adição de fósforo inorgânico em rações de origem vegetal para suínos e, conseqüente diminuir a excreção desse nutriente, foi realizado um trabalho com o objetivo de analisar a ação de três fitases distintas de

micro-organismos e fitase comercial. Os dados mostraram que a adição desses catalisadores aumentaram a digestibilidade do alimento para até 53% quando utilizado a enzima comercial e o mesmo resultado foi observado para as outras três amostras (Poulsen, 2010).

Vandenberg (2011) demonstrou a investigação dos efeitos da adição de fitases microbianas encapsuladas, em ração composta por proteínas vegetais na dieta de truta (*Oncorhynchus mykiss*). Os resultados apontaram que apesar de o processo de encapsulação ter reduzido a atividade da fitase, esses aditivos aumentaram a disponibilidade e digestibilidade de nutrientes do complexo alimentício estudado, assim como melhoraram a performance do crescimento dos animais (Vandenberg, 2011).

3 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo utilizar o resíduo agroindustrial torta de tungue para a produção da enzima fitase e simultânea detoxificação do subproduto, por fermentação em estado sólido por *Paecilomyces variotii*.

Objetivos específicos:

- Produção de fitase pelo fungo *Paecilomyces variotii* através de fermentação em estado sólido;
- Otimização das condições de produção da enzima utilizando estratégia de delineamento experimental de variáveis;
- Caracterização Bioquímica do extrato bruto de fitase obtido após otimização do processo;
- Detoxificação do resíduo torta de tungue pelo fungo *P. variotii*.

4 Material e métodos

4.1 Caracterização e preparo do substrato.

A torta de tungue utilizada como substrato para fermentação em estado sólido foi fornecida pelo Laboratório de Piscicultura/Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, sendo o resíduo oriundo das Indústrias de Óleo Varela LTDA (Fagundes Varela, Rio Grande do Sul). A composição centesimal foi realizada por Pretto (2013), que utilizou o substrato de mesma procedência.

4.1.2 Determinação do pH.

Foram adicionados 5 mL de água deionizada a 0,5 g de amostra, em seguida a mistura foi vigorosamente agitada e deixada em descanso. Após 10 minutos, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro (Marte®-MB-10).

4.1.3 Umidade.

Alíquotas de 1,0 g do substrato(triplicata) foram pesadas em balança analítica, utilizando placas de Petri previamente taradas. Após um período de 24 horas em estufa a 105°C, as mesmas foram pesadas e comparadas aos pesos iniciais (Madeira, 2010).

4.1.4 Granulometria.

Para o estudo de produção da fitase, o substrato composto pela torta de tungue foi submetido ao processo de separação granulométrica de acordo com os valores descritos na tabela 3 do item 4.3.2. O procedimento foi realizado utilizando peneiras de diferentes tamis (0,8-3,35mm).

*OBS: O processo de extração do óleo de tungue não resulta na produção de torta de tungue com granulometria uniforme, sendo possível sua separação em diferentes tamanhos.

4.2 Cultivo do Micro-organismo e Análises do Extrato Enzimático.

4.2.1 Micro-organismo

A cepa de *Paecilomyces variotii* (Figura 7) foi cultivada em meio "Potato Dextrose Agar" (PDA – OXOID - CM0139) em tubos de ensaio, e incubada a 30°C por 72 horas (Estufa de Cultura Modelo 002 CB - FANEM-LTDA). Após crescimento, parte dos tubos de cultura foi armazenada a 4°C sobre camada de vaselina esterilizada e repicada de três em três meses afim de manter a linhagem ativa (Macedo et al. 2005). A outra parte foi armazenada em condições semelhantes, com a diferença de ausência da vaselina. Essa parcela foi utilizada para preparo do pré-inóculo (item 4.2.2).



Figura 7: *Paecilomyces variotii* em tubos de ensaio sem e com vaselina.

4.2.2 Pré-inóculo.

Para o preparo do pré-inóculo, o fungo *Paecilomyces variotii* foi repicado em meio PDA em placas de Petri e incubado por 72 horas a 30°C em estufa. Após seu crescimento foram retiradas 10 áreas circulares com área de 1,54 cm² (d = 1,4 cm) e adicionadas em 100 mL de água destilada estéril, padronizando concentração de 10⁷ células/mL. Para

suspensão dos esporos foi utilizado homogeneizador do tipo Turrax (Ultra-Turrax® T50) Battestin(2007).

4.2.3 Meio de fermentação para produção de fitase.

O meio de fermentação foi preparado em Erlenmeyers de 250 mL contendo um total de 10 g do resíduo agroindustrial, o qual foi esterilizado em autoclave por 20 min a 120°C e complementado com 9 mL de água destilada estéril. Em seguida, foi adicionado 1 mL da suspensão de esporos do pré-inóculo preparado no item 4.2.2. Os Erlenmeyers foram então incubados em estufa a 30°C por 72 horas.

4.2.4 Extração enzimática

Passadas 72 horas de crescimento do fungo no meio de fermentação, foi realizada a etapa de extração enzimática, na qual foi adicionado 100mL de tampão acetato 0,02M - pH 5 para cada Erlenmeyer do processo (Madeira,2010). Em seguida, os frascos foram submetidos à agitação em shaker por 1 hora a 200 rpm (Battestin, 2007b). Após este procedimento, a mistura foi filtrada em gaze para separação dos componentes sólido-líquido. A parte sólida foi então denominada extrato sólido bruto. A parcela líquida filtrada e submetida à centrifugação a 7.100 g por 30 min a 4°C (Beckman Coulter – Allegra™ X-22R Centrifuge), foi identificada como extrato bruto enzimático (Lekha, 1997). O fermentado sólido foi submetido aos testes de detoxificação do éster de forbol, enquanto o extrato bruto foi submetido aos experimentos de análise de produtividade e caracterização da enzima fitase.

4.2.5 Determinação de atividade enzimática da Fitase.

A produção de fitase foi mensurada de acordo com o teste colorimétrico proposto por Shimizu (1992) com algumas modificações, o qual é embasado na liberação de fosfato inorgânico a partir do composto fitato de sódio. A reação foi realizada com 600µl do substrato fitato de sódio (Sigma-Aldrich Steinheim, Germany) 0,002 M em solução com

tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5, com adição de 150µl de extrato enzimático bruto. A mistura foi incubada em banho Maria a 37°C por 10 min. Passado o determinado período, a reação foi interrompida com a adição de 750µl de Ácido Tricloro Acético (TCA) a 5%. Por fim, foi adicionado 1,5 ml do reagente de cor para formação do composto fosfomolibdato com coloração azul. A composição do reagente colorimétrico foi de 4 volumes de molibdato de amônio 1,5% em solução de H₂SO₄ 5,5% e 1 volume de solução de sulfato ferroso 2,7%. Foi então realizada a leitura em espectrofotômetro a 700nm para determinação da liberação do fósforo inorgânico (Pi) frente a um branco sem adição de enzima e ao controle isento de substrato. Considerando que uma unidade de atividade enzimática (U) é referente a liberação de 1µmol de Pi por minuto de reação. A unidade de atividade foi definida como U por grama de substrato seco (U/gss). O curso da reação foi acompanhado por curva padrão de K₂HPO₄.

4.2.6 Determinação de proteínas totais por método de Bradford.

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), calculando a concentração de proteínas a partir da curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina.

4.3 Otimização das condições de produção da Fitase.

4.3.1 Delineamento experimental para otimização da composição do meio de fermentação para produção de fitase.

Com objetivo de definir variáveis que pudessem influenciar na produção enzimática durante a FES utilizando o fungo *Paecilomyces variotii*, foi adotada inicialmente a estratégia de planejamento fatorial fracionado. Foram estudados cinco fatores (tabela 1) obtendo-se um fatorial 2⁵⁻¹ mais 3 repetições no ponto central, os quais representaram um total de 19 ensaios representados em matriz codificada, como descrito na tabela 2. Após selecionados os possíveis compostos influentes, foi aplicado um planejamento composto

central rotacional (DCCR) visando atingir o ponto ótimo da produção enzimática. O estudo e análise dos dados gerados para o procedimento de otimização foram realizados através do software Statistica 7.0.

Tabela 1 : Concentração dos nutrientes utilizados no planejamento fatorial fracionado.

Níveis	-1	0	1
Variáveis			
Ácido Fítico(%)	0	0,25	0,5
K ₂ HPO ₄ / Na ₂ HPO ₄ (%)	0	0,2	0,4
Extrato de levedura (%)	0	0,1	0,5
Sulfato de Amônia (%)	0	0,2	0,5
Glicose(%)	0	1	2

Tabela 2: Matriz codificada do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Ensaio	Ácido Fítico (%)	K ₂ HPO ₄ / Na ₂ HPO ₄ (%)	Sulfato de Amônia (%)	Extrato de Levedura (%)	de Glicose (%)
1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(2) 1
2	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1
3	(0) -1	(0,4) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1
4	(0,5) 1	(0,4) 1	(0) -1	(0) -1	(2) 1
5	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1
6	(0,5) 1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1	(2) 1
7	(0) -1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0) -1	(2) 1
8	(0,5) 1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1
9	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1
10	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(2) 1
11	(0) -1	(0,4) 1	(0) -1	(0,5) 1	(2) 1
12	(0,5) 1	(0,4) 1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1
13	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(0,5) 1	(2) 1
14	(0,5) 1	(0) -1	(0,5) 1	(0,5) 1	(0) -1
15	(0) -1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0,5) 1	(0) -1
16	(0,5) 1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0,5) 1	(2) 1
17	(0,25) 0	(0,2) 0	(0,1) 0	(0,2) 0	(1) 0
18	(0,25) 0	(0,2) 0	(0,1) 0	(0,2) 0	(1) 0
19	(0,25) 0	(0,2) 0	(0,1) 0	(0,2) 0	(1) 0

*Os valores entre parênteses representam os valores reais das concentrações de cada variável.

4.3.2 Influência das variáveis físicas do substrato na produção enzimática.

A avaliação da influência das condições físicas do substrato: granulometria, umidade e tratamento térmico (tempo autoclavagem), foi estudada para finalizar os testes de otimização (tabela 3). Os experimentos foram realizados através de um delineamento

fatorial completo 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios, todos eles realizados em triplicatas (tabela 4). O estudo e análise dos dados gerados para o procedimento de otimização foram realizados através do software Statistica 7.0.

Tabela 3: Níveis do fatorial completo 2^3 para otimização das variáveis físicas da otimização.

Variáveis	Níveis	$-\alpha$	-1	0	1	A
Granulometria(mm)		0,8	1,68	2	2,8	3,35
Umidade (%)		53	65	76	88	100
Tratamento Térmico(min.)		15	20	30	40	45

Tabela 4: Matriz codificada para o DCCR completo 2^3 .

Ensaios	Granulometria (mm)	Umidade (%)	Tratamento Térmico (min.)
1	(1,68)-1	(65)-1	(20)-1
2	(2,8)1	(65)-1	(20)-1
3	(1,68)-1	(88)1	(20)-1
4	(2,8)1	(88)1	(20)-1
5	(1,68)-1	(65)-1	(40)1
6	(2,8)1	(65)-1	(40)1
7	(1,68)-1	(88)1	(40)1
8	(2,8)1	(88)1	(40)1
9	(0,8)-1,68	(76)0	(30)0
10	(3,35)1,68	(76)0	(30)0
11	(2,0)0	(53)-1,68	(30)0
12	(2,0)0	(100)1,68	(30)0
13	(2,0)0	(76)0	(15)-1,68
14	(2,0)0	(76)0	(45)1,68
15	(2,0)0	(76)0	(30)0
16	(2,0)0	(76)0	(30)0
17	(2,0)0	(76)0	(30)0

*Os valores entre parênteses representam os valores reais das concentrações de cada variável.

** Tratamento térmico = Tempo de autoclavagem, Temperatura: 121°C.

4.4 Caracterização bioquímica da fitase produzida por *Paecilomyces variotii*.

4.4.1 Determinação do pH ótimo e de estabilidade.

Para determinar o pH ótimo da enzima foram utilizadas diferentes soluções tampão, substituindo o tampão acetato 0,2M por: tampão citrato 0,1M pH 2,5 e 3,0, acetato 0,1M pH 4,0 e 5,0, tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0 e 8,0, borato 0,1M pH 9,0 e 10,0 e tampão borato-NaOH pH 11,0 (Ries, 2010). A atividade de fitase foi determinada através da metodologia proposta por Shimizu (1992), a qual utiliza o composto fitato de sódio como substrato descrita no item citado acima.

Na determinação do pH de estabilidade, 1,5 mL do extrato enzimático bruto foi adicionado a 1,5 mL das soluções tampão em diferentes valores de pH citadas anteriormente, permanecendo a 37°C por 2 horas. Realizado o tratamento, os diferentes valores de pH foram ajustados para o valor correspondente a metodologia de atividade proposta inicialmente (pH 5,0).

4.4.2 Determinação de temperatura ótima e de estabilidade.

De acordo com a metodologia de atividade enzimática descrita no item 4.2.5, foi avaliado o efeito da temperatura durante a reação catalítica variando as temperaturas de incubação em 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e ebulição, afim de achar a condição ótima funcional da fitase de *Paecilomyces variotii*.

Para determinar a faixa de temperatura de estabilidade da enzima, o extrato bruto enzimático foi incubado nas temperaturas descritas acima, pelo período de 1hr (Ries, 2010). Após esse procedimento a atividade residual foi quantificada de acordo com procedimento padrão (item 4.2.5).

*OBS: Para efeito de comparação do perfil bioquímico da fitase de *Paecilomyces variotii* frente as fitases comerciais de *A. niger* e *E. coli*, foram utilizados dados da tese de doutorado de Ries(2010) que possibilitaram a ilustração das figuras 12, 14, 16 e 18.

4.4.3 Influência de sais e inibidores na atividade enzimática.

Com o intuito de avaliar o efeito de inibidores da atividade enzimática em meio reacional, foi analisada a adição dos sais $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , CuSO_4 , $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, BaSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , HgCl_2 e EDTA, nas concentrações de 1 e 10 mM (Ries, 2010). A mensuração de atividade foi realizada de acordo com a metodologia padrão proposta no item 4.2.5.

4.5 Detoxificação da torta de tungue.

4.5.1 Extração e quantificação dos ésteres de forbol.

A extração dos ésteres de forbol da torta de tungue crua, autoclavada e fermentada foi realizada com metanol de acordo com a metodologia de Saetae and Suntornsuk (2010). Foram adicionados 20 ml de metanol para cada 5g de torta de tungue a cada frasco, em seguida a mistura foi agitada em shaker a 200 rpm por 5 min. Após esse período, a mistura foi filtrada em papel filtro Whatman N° 1, o filtrado foi recolhido, enquanto que a torta passou pelo mesmo processo mais 4 ciclos. O extrato recuperado foi submetido a rota evaporação para obtenção de frações concentradas de Ester de forbol, as quais foram ressuspensas em 5ml de metanol.

Para quantificação dos ésteres de forbol extraídos, foi utilizado HPLC equipado com detector UV e coluna de fase reversa Atlantis® C18 [5 μm , 4.6 x 250 mm]. A separação foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wink ET al. (2000). Os solventes utilizados foram água e acetonitrila, iniciando com 60% de água(A) e 40% acetonitrila (B); após 15 min. ocorreu diminuição de A para 25% e aumento de B para 75%, nos próximos 20 min. aumento de 100% de B. A coluna foi então lavada com metanol. O processo de separação ocorreu a temperatura ambiente (25°C) com fluxo de 1,3 ml/min. O padrão utilizado foi o Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA).

4.5.2 Determinação da citotoxicidade da torta de tungue crua e fermentada por teste MTT.

Para analisar a eficiência da detoxificação do substrato após as fermentações, foi utilizado o teste MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) de acordo com metodologia de Mosmann (1983). Durante os ensaios, células de camundongos do tipo RAW 264,7 foram cultivadas em meio DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) em estufas a 37 °C na presença de CO₂. Para 100 µL de cultura de células, um volume de 100 µL de MTT (5 mg/mL em PBS) e extrato da amostra foram adicionados em poços de microplacas. Cada microplaca foi incubada em estufa durante o período de 24 horas. Antes e após incubação, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A taxa de redução de MTT (densidade óptica) para cada amostra foi calculada por diferença entre a primeira e segunda leitura. O ensaio foi conduzido utilizando o extrato de forbol obtido do substrato, como descrito no item 4.5.1, com algumas modificações. Após a etapa de concentração em rota evaporador o conteúdo foi recuperado com adição de água e meio DMEM (1:1). Considerando as concentrações do éster encontradas pelos testes de quantificação foram determinadas as diluições dos extratos, tanto para os resíduos brutos quanto fermentados, para aplicação nas culturas celulares nas condições de 3,75 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL e 0,625 µg/mL, afim de avaliar a toxicidade.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização e preparo da torta de tungue para fermentação.

Os dados que caracterizam a torta de tungue utilizada como substrato para o processo de FES: determinação do pH, umidade e granulometria, assim como os dados referentes a composição centesimal (Pretto 2013), estão descritos nas tabelas 5 e 6 a seguir.

Tabela 5: Caracterização da torta de tungue em relação ao pH, umidade e granulometria.

Propriedades torta de tungue	Média - Desv. Padrão
pH	5,93 ± 0,09
Umidade (%)	10,04 ± 0,43
Granulometria (mm)	1,68 ± 0

Tabela 6: Caracterização da torta de tungue em relação ao pH, umidade e granulometria.

Frações alimentares (% base seca)	Torta de tungue
Matéria mineral	7,02 ± 0,12
Proteína	27,96 ± 0,52
Gordura	3,34 ± 0,41
FDN	52,25 ± 1,04
Cálcio	0,38 ± 0,03
Fósforo	0,49 ± 0,01

*FDN: Teor de fibras em detergente neutro.

Fonte: Pretto(2013).

Como pode ser analisado na tabela 5 a torta de tungue demonstrou leve acidez devido ao pH 5,93. A umidade das amostras de tungue por teste de gravimetria em estufa revelou-se próxima a 10 %. A granulometria foi utilizada como variável para otimização da produção enzimática como será discutido adiante no item 5.3.2, entretanto, de acordo com experimentos prévios e seus resultados esse fator foi fixado em 1,68mm. Poucos dados sobre a torta de tungue são encontrados na literatura, dessa forma, para deixar mais claro suas características nutricionais, foi utilizada a tabela de composição centesimal realizada pelo Laboratório de Piscicultura/Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (Pretto,2013). A extração do óleo do tungue foi realizada através do processamento das amêndoas juntamente com o endocarpo (estrutura interna do fruto que protege as amêndoas), o que explica o alto teor de fibras acima dos 50% na torta de tungue, além disso o coproduto apresentou 7% de minerais, 3,34% de gordura residual e aproximadamente 27% de proteína.

5.2 Experimentos preliminares à otimização da produção de fitase: cinética da reação enzimática e da fermentação.

Para analisar o comportamento da atividade enzimática pelo método proposto no item 4.2.5, foi realizada a cinética do meio de reação, na qual foi possível avaliar a liberação do fósforo inorgânico em relação ao tempo de ação da fitase. Os dados obtidos experimentalmente estão dispostos no gráfico (Absorbância x Tempo) da figura 8.

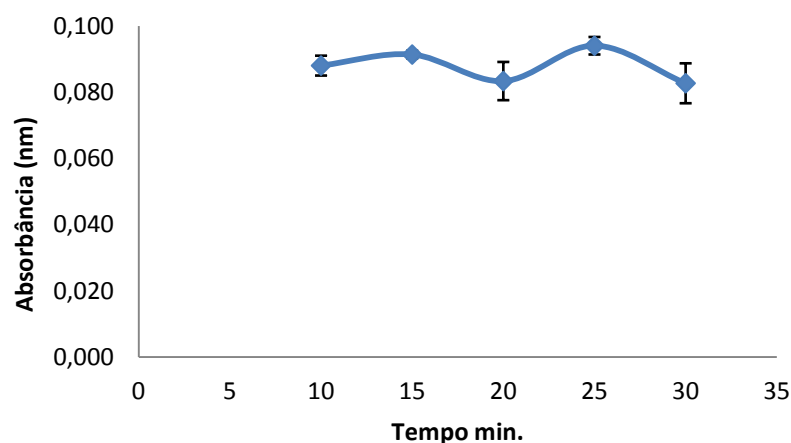


Figura 8: Cinética da atividade enzimática da fitase de *Paecilomyces variotii*.

Na leitura do gráfico absorbância/tempo de reação, pode-se afirmar que a liberação de fósforo no tempo de 10 a 30 minutos foi praticamente constante, pois os valores de absorbância, a partir do menor tempo, variam insignificamente. A partir desses dados, o tempo de reação foi fixado em 10 minutos para todas as análises de atividade enzimática de fitase realizadas neste trabalho.

A partir do gráfico da cinética de fermentação (figura 9), os resultado para a produção da fitase através do processo de FES nos tempos de fermentação de 48, 72, 96 e 120 horas.

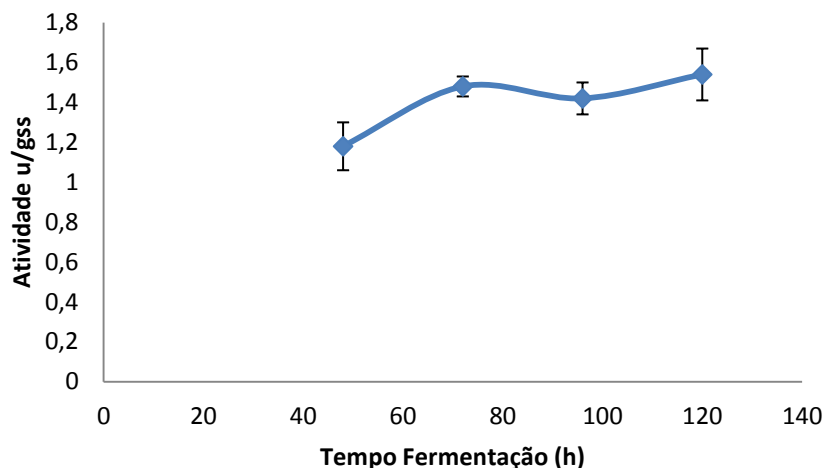


Figura 9: Cinética de fermentação para produção de fitase de *P. variotii*.

*U/gss = Unidade por grama de substrato sólido.

Na figura 6, é possível notar a síntese de fitase a partir do menor tempo de incubação (48h), com atividade cerca de 1U/gss. No entanto, os pontos de melhor rendimento da produção se encontram a partir das 72h, em que o fungo produziu extrato enzimático com atividade de 1,5 U/gss. Como nos tempos de 96 e 120 horas, a produtividade não foi significativamente maior, além de obviamente tomar mais tempo, os ensaios para otimização da produção da fitase foram estabelecidos no tempo de 72h de fermentação.

5.3 Otimização da produção da fitase no substrato tungue.

5.3.1 Otimização da composição do substrato de FES para produção da fitase.

Para otimizar a produtividade da fitase produzida pelo fungo *Paecilomyces variotii*, foi utilizada uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais, afim de determinar fatores que pudessem influenciar no processo de fermentação em estado sólido.

No início do processo de otimização foi adotado um delineamento fracionado 5^{2-1} mais 3 repetições no ponto central. As variáveis ácido fítico, K_2HPO_4/Na_2HPO_4 , sulfato de amônio, extrato de levedura e glicose foram avaliadas sempre a partir da concentração nula até sua concentração máxima descrita na tabela 1 do item 4.3.1. Esses nutrientes foram estudados afim de avaliar se haveria a necessidade de suplementação da torta de tungue por indutores, fontes de nitrogênio e fonte energética, sendo os compostos descritos conhecidos por aumentar o rendimento da produção de fitase por micro-organismos (Li et al, 2008; Gosh, 2011; Madeira Jr. et al, 2011). As atividades enzimáticas obtidas nos experimentos e apresentadas na matriz da tabela 7 foram submetidas a análise do software Statistica 7.0, o qual gerou a tabela de efeitos (tabela 8), com nível de significância definido a 10% ($p < 0,1$).

Tabela 7: Matriz codificada e valores reais do planejamento fracionado 52-1 mais 3 repetições no ponto central e atividade enzimática obtida experimentalmente.

Ensaio	Ácido Fítico (%)	K ₂ HPO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (%)	Sulfato de Amônia (%)	Extrato de Levedura (%)	Glicose (%)	At. Enzimática (U/gss)
1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(2) 1	2,172
2	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	4,491
3	(0) -1	(0,4) 1	(0) -1	(0) -1	(0) -1	4,026
4	(0,5) 1	(0,4) 1	(0) -1	(0) -1	(2) 1	3,957
5	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1	0,807
6	(0,5) 1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1	(2) 1	2,811
7	(0) -1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0) -1	(2) 1	3,921
8	(0,5) 1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1	3,921
9	(0) -1	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1	0,876
10	(0,5) 1	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(2) 1	1,959
11	(0) -1	(0,4) 1	(0) -1	(0,5) 1	(2) 1	3,936
12	(0,5) 1	(0,4) 1	(0) -1	(0,5) 1	(0) -1	3,768
13	(0) -1	(0) -1	(0,5) 1	(0,5) 1	(2) 1	0,51
14	(0,5) 1	(0) -1	(0,5) 1	(0,5) 1	(0) -1	1,494
15	(0) -1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0,5) 1	(0) -1	4,062
16	(0,5) 1	(0,4) 1	(0,5) 1	(0,5) 1	(2) 1	3,675
17	(0,25) 0	(0,2) 0	(0,1) 0	(0,2) 0	(1) 0	3,294
18	(0,25) 0	(0,2) 0	(0,1) 0	(0,2) 0	(1) 0	3,459
19	(0,25) 0	(0,2) 0	(0,1) 0	(0,2) 0	(1) 0	3,69

*U/gss: Unidade enzimática por grama de substrato sólido.

Tabela 8: Matriz codificada e valores reais do planejamento fracionado 52-1 mais 3 repetições no ponto central e atividade enzimática obtida experimentalmente.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(13)	p-valor	Estimativas por intervalo 90%	
					Limite inferior	Limite superior
Média	2,991	0,178	16,829	0,000	2,676	3,306
Ácido Fítico	0,721	0,387	1,861	0,086	0,035	1,407
K ₂ HPO ₄ /Na ₂ HPO ₄	2,018	0,387	5,210	0,000	1,332	2,704
Sulfato de Amônio	-0,498	0,387	-1,286	0,221	-1,184	0,188
Extrato de levedura	-0,728	0,387	-1,880	0,083	-1,414	-0,042
Glicose	-0,063	0,387	-0,163	0,873	-0,749	0,623

Na tabela 8 estão dispostos os efeitos referentes aos compostos adicionados ao substrato de fermentação. Três dos fatores estudados demonstraram algum tipo de influência durante a produção da enzima. Os sais fitato de sódio e a mistura K_2HPO_4/Na_2HPO_4 (1:1), confirmaram sua influência para a produção de fitase, apresentando efeitos significativamente ($p < 0,1$) positivos no aumento da produtividade dessa enzima. Fato que é evidente na visualização dos ensaios 2 e 15 descritos na tabela 7. Por ser um complexo de fósforo orgânico e estável onde há a necessidade de utilização de enzimas para liberação dos P(i), esse composto é conhecido como indutor natural da produção de fitases. Já a combinação K_2HPO_4/Na_2HPO_4 (1:1) pode ter agido como um tampão para o meio de fermentação, aumentando a síntese de fitase (Gosh, S., 2011).

A adição do extrato de levedura, entretanto, causou efeito negativo para a otimização do processo, logo, foi desconsiderado. Por outro lado, o sulfato de amônio e a glicose não apresentaram influência significativa para esses ensaios.

A partir do delineamento fracionado foi possível identificar duas variáveis que influenciaram na produtividade da fitase. Os fatores positivos fitato de sódio e a mistura de sais K_2HPO_4/Na_2HPO_4 (1:1) foram submetidos à estratégia de delineamento composto central rotacional (DCCR), afim de consolidar o ponto ótimo da produção da enzima. Foi então estudado um DCCR 2^2 com mais 3 replicatas no ponto central com total de 11 ensaios, os quais geraram a matriz e as respectivas atividades experimentais descritas na tabela 9.

Tabela 9: Matriz codificada, valores reais e atividade enzimática dos experimentos.

Ensaio	x1	x2	Fitato (%)	K ₂ HPO ₄ /Na ₂ HPO ₅ (%)	At. Enzimática (U/gss)
1	-1,00	-1,00	0,1	0,1	0,9
2	1,00	-1,00	1	0,1	2,14
3	-1,00	1,00	0,1	1	2,95
4	1,00	1,00	1	1	2,98
5	-1,41	0,00	0	0,5	3,36
6	1,41	0,00	1,5	0,5	3,26
7	0,00	-1,41	0,5	0	0,65
8	0,00	1,41	0,5	1,5	3,15
9(C)	0,00	0,00	0,5	0,5	3,17
10(C)	0,00	0,00	0,5	0,5	3,17
11(C)	0,00	0,00	0,5	0,5	3,06

*U/gss: Unidade enzimática por grama de substrato sólido.

A análise estatística dos valores codificados da matriz e seus respectivos dados experimentais deu origem a tabela 10, a qual permitiu avaliar os efeitos proporcionados pelos aditivos durante a FES para produção da fitase, assim como os coeficientes de regressão para ajustar a equação do modelo.

Tabela 10: Coeficientes de regressão e efeitos dos indutores da síntese de fitase.

Fatores	Coeficientes regressão	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Estimativas por intervalo 90%	
						Limite inferior	Limite inferior
Média	3,13	3,13	0,20	16,05	0,00	2,74	3,53
(1)Ácido Fítico (L)0	0,14	0,28	0,24	1,18	0,29	-0,20	0,76
Ácido Fítico (Q)	0,00	0,00	0,28	-0,02	0,99	-0,58	0,57
(2)K ₂ HPO ₄ /Na ₂ HPO ₄	0,80	1,61	0,24	6,72	0,00	1,12	2,09
K ₂ HPO ₄ /Na ₂ HPO ₅	-0,71	-1,41	0,28	-4,97	0,00	-1,99	-0,84
1L /2L	-0,30	-0,61	0,34	-1,79	0,13	-1,29	0,08

De acordo com a tabela de efeitos, é possível afirmar que a variável que aumentou a produção enzimática, foi a mistura de sais K₂HPO₄/Na₂HPO₄(1:1), pois a adição do ácido fítico foi irrelevante ($p > 0,1$) perante as análises estatísticas desses experimentos. Como descrito por alguns autores, a grande maioria dos vegetais oleaginosos possuem altas quantidades de fitato de sódio (até 6%) em sua estrutura, a torta de tungue por sua vez apresenta em sua composição aproximadamente 1,6% desse antinutriente (Pretto, 2013). Portanto, por já apresentar quantidade considerável de ácido fítico, o substrato por si já demonstra capacidade indutora da produção de fitase, com isso não havendo necessidade de sua adição no sistema fermentativo. É importante destacar que a adição mínima dos sais inorgânicos foi capaz de dobrar a atividade da fitase, que resulta em melhora significativa nas condições do processo, pois o aditivo aqui necessário é de fácil aquisição, mais acessível financeiramente e necessário apenas em pequenas quantidades(0,5%) para o sucesso da fermentação.

Abaixo está esquematizada a equação ajustada ao modelo quadrático utilizada para calcular as atividades previstas, de acordo com a análise da tabela de efeitos e seus respectivos coeficientes de regressão:

$$Y = 3,13 + 0,8X_2 - 0,7X_2^2 \quad \text{ou} \quad \text{Fitase(U/gss)} = 3,13 + 0,8 (K_2HPO_4/Na_2HPO_4) - 0,7(K_2HPO_4/Na_2HPO_5)^2.$$

Definida a equação quadrática ajustada ao modelo, foi realizada a ANOVA do sistema matemático para confirmação de sua validade, representada na tabela 10.

Tabela 11: ANOVA do modelo predito para a produção de fitase.

Fontes de variação	SQ	GL	QM	Fcal	p-valor
Regressão	8,242	2	4,121	30,08	0,0007
Resíduo	1,098	8	0,137		
Falta de ajuste	1,09	6	0,181	45,25	
Erro puro	0,008	2	0,004		
Total	9,34	10			

$F_{tab}(0,1; 2;8) = 3,11$ e $F_{tab}(0,1; 6;2) = 9,33$ $R^2 = 88,2\%$.

A ANOVA para a produção da enzima fitase considerando apenas os dados estatisticamente significativos ($p < 0,1$) foi avaliada para o ajuste do modelo apresentando coeficiente de determinação (R^2) 88,2%. O teste F foi altamente significativo para a regressão, portanto, o modelo foi adequado para descrever os dados através da superfície de resposta (figura 10).

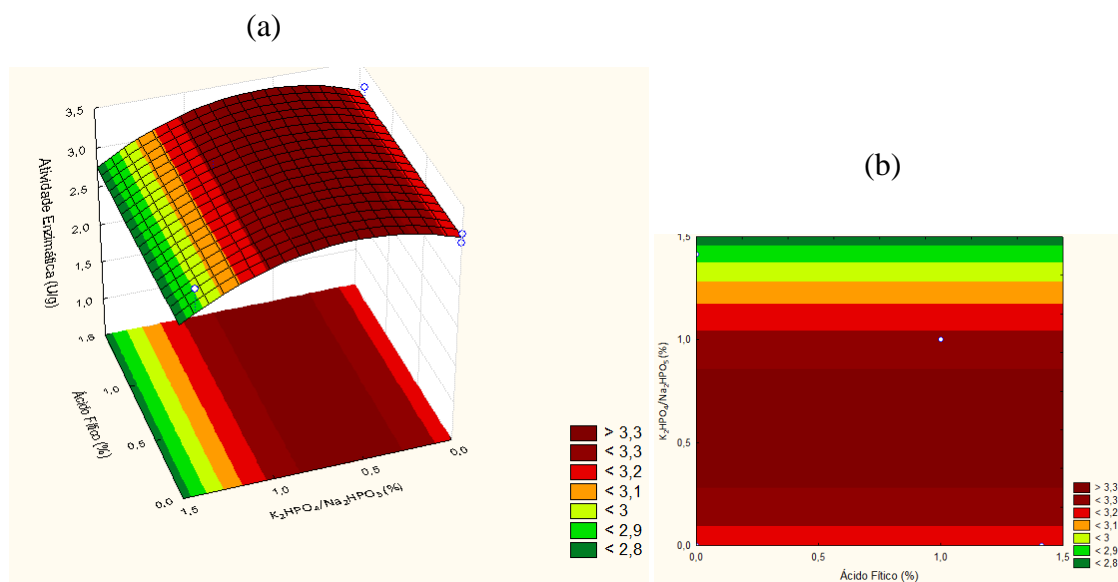


Figura 10: Superfície de resposta para otimização da produção da fitase.

Pela análise da superfície de resposta, representada pelas figuras 7(a) (b), foi possível identificar o ponto ótimo de produção da enzima de acordo com as concentrações dos aditivos

estudados. Os níveis 0% de ácido fítico(- α) e 0,5% (0-ponto central) da mistura de sais de fósforo apresentaram-se como a combinação que resultou na maior atividade de fitase obtida durante a otimização, com valor aproximado de 3,5 U/gss. Com isso, reafirmando a independência da utilização do fitato para o incremento na produtividade da enzima em FES.

Quando escolhidas estratégias de delineamento experimental, é importante verificar a validação das respostas preditas frente aos dados obtidos experimentalmente. Embora as avaliações estatísticas tenham confirmado-se válidas, a partir do erro de ajuste e erros relativos de cada ensaio, foi possível calcular a tabela 12 das respostas experimentais versus preditas pelo modelo.

Tabela 12: Respostas experimentais versus preditas pelo modelo.

Números Ensaio	At. Enzimática (U/gss)	At. Enzimática modelo (U/gss)	Erro de ajuste	Erro relativo (%)
1	0,9	1,18	-0,28	-30,78
2	2,14	2,06	0,08	3,55
3	2,95	3,39	-0,44	-14,86
4	2,98	3,07	-0,09	-2,87
5	3,36	3,00	0,36	10,71
6	3,26	3,33	-0,07	-2,09
7	0,65	0,58	0,07	10,33
8	3,15	2,85	0,30	9,38
9	3,17	3,13	0,04	1,16
10	3,17	3,13	0,04	1,16
11	3,06	3,13	-0,07	-2,40

*U/gss: Unidade enzimática por grama de substrato sólido.

Os erros relativos tiveram variação de 1 a 30%, sendo que na região de interesse (ensaio 5), onde foi determinada a maior atividade, essa relação manteve-se baixa considerando a manipulação de processo com micro-organismo. A única exceção, que aproxima-se dos 30%, está localizada em um dos pontos de menor atividade(ensaio 1), o que não influencia na validação do modelo.

Para comprovar a repetibilidade dos ensaios nos níveis escolhidos pela otimização foram realizadas novas fermentações (tabela 13).

Tabela 13: Repetição da fermentação no ponto(condição) otimizado de produção enzimática e atividade específica da fitase.

Tempo Fermentação (h)	Atividade enzimática (U/gss) \pm Desv.Padrão	Atividade enzimática específica (U/gss por mg proteína) \pm Desv.Padrão
72	3,25 \pm 0,33	9,56 \pm 0,98

*Meio de produção otimizado: 10g torta de tungue, 10mL água + 0,5% K_2HPO_4/Na_2HPO_4 .

Como esperado, na avaliação representada acima foi constatado o valor de 3,25 U/g de atividade para fitase em 72 horas de fermentação sólida, confirmando assim a repetição dos dados apresentados no planejamento. Considerando o extrato bruto enzimático que obteve 0,34 mg de proteína por grama de substrato seco (torta de tungue), a atividade específica foi 9,56 U/gss por miligrama de proteína.

As fitases têm movimentado milhares de dólares pelo mundo por serem uma alternativa de aditivo nutricional sustentável e menos prejudicial ao meio ambiente. Por isso, vários autores têm descrito novas tentativas de melhorar sua produtividade. Utilizando linhagem de *Aspergillus niger* em farelo de trigo, Greiner, R. *et al.*(2009), produziram extrato bruto enzimático de fitase com atividade específica de 2,6 U/mg de proteína.

R. Rani and S. Ghosh (2011) demonstraram a otimização do meio de produção da fitase de *Rizhopus oryzae* que rendeu um aumento de aproximadamente 8 vezes na atividade da enzima quando utilizada estratégia de delineamento experimental. Contudo, considerando a unidade de mensuração da liberação do fósforo durante a reação enzimática a atividade obtida foi de aproximadamente 0,15U/gss, que em termos de comparação com a fitase de *P. variotii* apresenta produtividade 20 vezes menor.

Em recente estudo, Escobin-Mopera, L. *et al.*(2012) reportaram a síntese da fitase de *Klebsiella pneumoniae* 9-3B em fermentador de 5 litros. Foi obtido grande quantidade de extrato bruto e boa recuperação na purificação da enzima, com atividade específica de 6,89

U/mg após purificação parcial com sulfato de amônio, ou seja, sem a etapa de purificação a fitase de *P. variotii* apresentou atividade específica 30% maior. Deste modo, pode-se afirmar que a fitase produzida nesse trabalho apresenta grande potencial de aplicabilidade, visto que sua capacidade de defosforilação do ácido fítico é tão eficiente quanto ou melhor que outras fitases de diferentes produtores aqui discutidos. É importante reforçar também, a sustentabilidade do processo e seu baixo custo de desenvolvimento.

5.3.2 Otimização das condições físicas do substrato para produção de fitase

Foram realizados novos testes de otimização da fermentação com o intuito de estudar os efeitos que variáveis físicas referentes ao substrato torta de tungue poderiam causar durante o processo. Como descrito no item 4.3.2, para avaliação foi aplicada a estratégia de delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com mais 3 replicatas no ponto central, analisando os fatores granulometria, umidade do meio e tratamento térmico.

Na tabela 14, estão representados os valores reais utilizados no estudo, assim como a matriz codificada utilizada para as análises estatísticas e as atividades experimentais obtidas para cada ensaio.

Tabela 14: Matriz codificada e valores reais com atividade enzimática de cada ensaio realizado.

Ensaio	x1	x2	x3	Granulometria (mm)	Umidade (%)	Tratamento Térmico (min.)	Atividade (U/gss)
1	-1,00	-1,00	-1,00	1,68	65	20	3,69
2	1,00	-1,00	-1,00	2,8	65	20	3,65
3	-1,00	1,00	-1,00	1,68	88	20	3,48
4	1,00	1,00	-1,00	2,8	88	20	3,63
5	-1,00	-1,00	1,00	1,68	65	40	3,24
6	1,00	-1,00	1,00	2,8	65	40	3,04
7	-1,00	1,00	1,00	1,68	88	40	2,5
8	1,00	1,00	1,00	2,8	88	40	2,28
9	-1,68	0,00	0,00	0,8	76	30	2,70
10	1,68	0,00	0,00	3,35	76	30	2,78
11	0,00	-1,68	0,00	2	53	30	2,68
12	0,00	1,68	0,00	2	100	30	2,62
13	0,00	0,00	-1,68	2	76	15	2,80
14	0,00	0,00	1,68	2	76	45	2,36
15	0,00	0,00	0,00	2	76	30	2,60
16	0,00	0,00	0,00	2	76	30	2,56
17	0,00	0,00	0,00	2	76	30	2,55

*U/gss: Unidade enzimática por grama de substrato sólido.

Através da análise estatística da matriz codificada e seus respectivos dados experimentais, foi possível obter a tabela 15, a qual apresenta todos os efeitos causados pelas variáveis independentes então trabalhadas. Foram considerados não significativos todos os parâmetros com p-valores maiores que 10% ($p < 0,1$).

Tabela 15: Coeficientes de regressão e efeitos para resposta de atividade enzimática.

Fatores	Efeitos	Coeficientes Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Estimativas por intervalo 90%	
						Limite inferior	Limite inferior
Média	2,54	2,54	0,25	10,14	0,00	2,06	3,01
(1)Granulometria (L)	-0,03	-0,01	0,23	-0,11	0,92	-0,47	0,42
Granulometria(Q)	0,35	0,18	0,26	1,37	0,21	-0,14	0,84
(2)Umidade(L)	-0,27	-0,13	0,23	-1,14	0,29	-0,71	0,18
Umidade(Q)	0,29	0,15	0,26	1,12	0,30	-0,20	0,78
(3)Tratamento térmico(L)	-0,60	-0,30	0,23	-2,57	0,04	-1,05	-0,16
Tratamento térmico(Q)	0,24	0,12	0,26	0,93	0,38	-0,25	0,73
1L / 2L	0,04	0,02	0,31	0,14	0,89	-0,54	0,62
1L / 3L	-0,13	-0,07	0,31	-0,43	0,68	-0,71	0,45
2L / 3L	-0,32	-0,16	0,31	-1,03	0,34	-0,90	0,26

Avaliando a tabela 15, é possível afirmar que nenhum fator, à exceção do tratamento térmico, foi significativo para contribuir na otimização da produção da fitase por FES. Apesar do tempo de autoclavagem possuir p-valor menor que 10%, o efeito causado pelo aumento do período de tratamento foi negativo, ou seja, houve diminuição da atividade enzimática quando a torta de tungue foi submetida a maior período em autoclave.

Portanto, conclui-se que os fatores físicos estipulados para este estudo não foram influentes para um melhor rendimento da fitase. Embora tal conclusão possa dar uma impressão negativa neste capítulo pelo fato de não aumentar a atividade do extrato enzimático. Por outra perspectiva, os dados fornecem outras informações.

Do ponto de vista da variável granulometria, é importante destacar que a indiferença em relação aos tamanhos das partículas simplifica o processo, considerando que resíduos provenientes de agroindústrias dificilmente serão disponibilizados em proporções padronizadas. Geralmente o tamanho das partículas do substrato é de grande importância para o crescimento do micro-organismo. Dessa forma, se a granulometria for muito alta a área de superfície disponível para o desenvolvimento do fungo será reduzida, por outro lado, se a dimensão for muita baixa é possível que haja a aglomeração do suporte em questão,

dificultando a oxigenação do meio bem como as transferências de massa que deveriam ocorrer livremente, prejudicando todo o processo.

Diferente do obtido nesse trabalho, Santos (2011), observou que durante a utilização de diferentes fontes de suportes para o crescimento de linhagem de *Aspergillus niger*, o tamanho das partículas foi significativamente importante. O autor percebeu que, quando as partículas foram menores que 1mm houveram aumentos relevantes no rendimento da produção de fitase. Outro estudo de síntese de fitase através de *Aspergillus ficuum* PTCC 5288, realizou os testes de granulometria do farelo de trigo na faixa de 0,2-1,4 mm dentro de uma seleção de variáveis por método Plackett-Burman. De acordo com o autor as análises estatísticas se mostraram significativamente influentes na produção da enzima, no entanto, não foram relevantes o suficiente para serem consideradas na estratégia de otimização final (Jafari-Tapeh *et al.*, 2012). Outra variável estudada por este autor foi a umidade inicial do meio, a qual apresentou ponto ótimo em 65%, sendo o micro-organismo susceptível a variações para mais ou menos em relação a este dado, diminuindo o rendimento da produção de fitase, o que não ocorreu com *P. variotii* no trabalho aqui discutido.

No teste de tratamento térmico do substrato, o aumento do período de exposição ao calor se mostrou prejudicial à otimização da fitase de *P. variotii*, o que ajuda na economia de energia, diminuindo o custo dos procedimentos. Bennett (2012) estudou o tempo de tratamento térmico durante a esterilização do substrato de fermentação sólida composto por lentilha, em autoclave. Segundo o autor, o fundo *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 apresentou aumentos de 6, 8,5 e 10 vezes quando o substrato umidificado foi autoclavado nos tempos de 20, 30 e 40min respectivamente. O fenômeno foi justificado pelo aumento da porosidade, devido a quebra das barreiras extracelulares da lentilha, disponibilizando mais espaço para o desenvolvimento do fungo. Na torta de tungue não foi observado o mesmo efeito, logo não havendo necessidade de acrescentar tal tratamento, a não ser para tornar o meio estéril.

5.4 Caracterização bioquímica do extrato bruto de fitase.

5.4.1 Determinação do pH ótimo e da faixa de estabilidade em pH da fitase de *P. variotii*.

Para determinar as características bioquímicas da fitase de *Paecilomyces variotii* por FES em torta de tungue, foi estudado o comportamento desta enzima em relação ao seu pH ótimo, estabilidade em pH, temperatura ótima, estabilidade em temperatura e a influência de sais como possíveis inibidores.

As figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, o comportamento da fitase produzida neste trabalho e a comparação entre uma enzima comercial de *Aspergillus niger* e outra de *E. coli* relação aos diferentes pHs descritos no item 4.4.1.

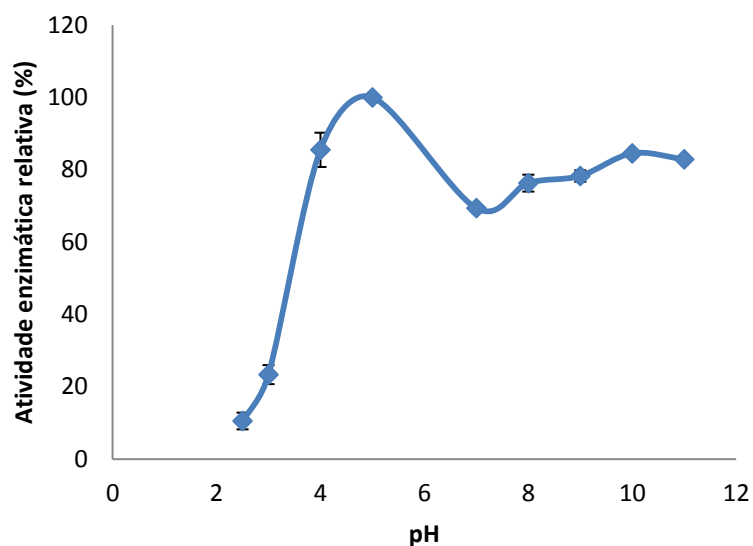


Figura 11: pH ótimo de atividade da fitase de *P. variotii*.

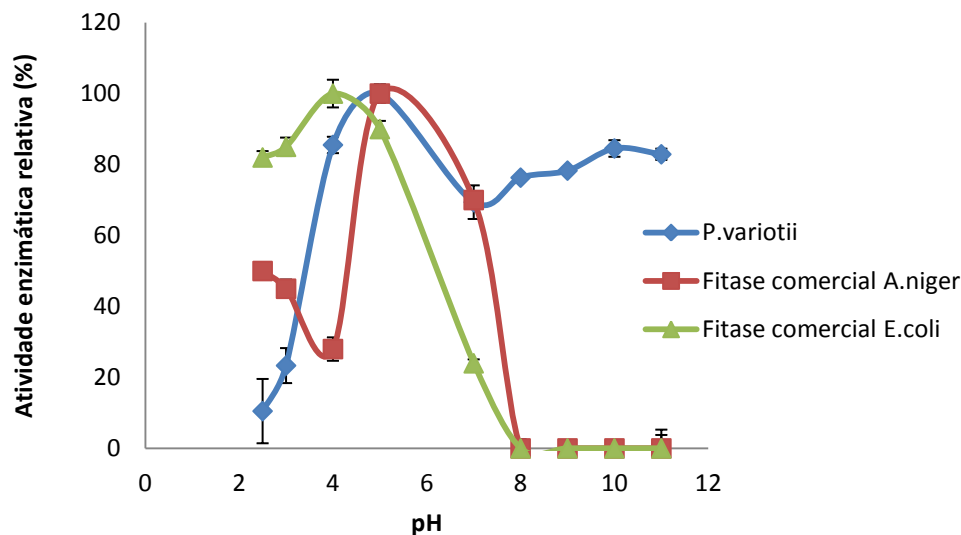


Figura 12: Comparação entre pH ótimo de atividade da fitase de *P. variotii* e das fitases comerciais de *A. niger* e *E. coli*.

A partir do perfil de atividade da fitase de *Paecilomyces variotii* representado na figura 11, pode-se afirmar que o pH 5,0 foi o que melhor influenciou no comportamento da enzima. Nos dados referentes aos pHs abaixo de 4,0 a atividade relativa foi drasticamente reduzida. Nos valores com aumento do pH até a neutralidade ocorreu queda da atividade relativa, sendo que com a alcalinização do meio de reação essa função volta a ter aumento considerável. Tal fato pode ser explicado pela mensuração da produtividade de fitase através do substrato enzimático bruto, possibilitando a presença de isoenzimas. Na figura 12 foi estabelecida comparação entre os comportamentos das enzimas bruta e comerciais, na qual ficou evidente a especificidade das enzimas puras em relação ao extrato bruto enzimático de *P. variotii*. As catalisadoras comerciais possuem picos de atividade em pH 5,0 e 4,0 respectivamente, já em pHs maiores se mostraram ineficientes, diferente do extrato produzido nesse estudo, o qual também apresentou alta atividade relativa em meio reacional alcalino. Segundo Liu *et al.* (1998), a maioria das fitases possuem pH ácido na faixa de 4,5-6,0, entretanto, recentes estudos mostram a possibilidade de síntese de fitases alcalinas com propriedades para suplementação de rações e alimentos. Como no trabalho de M. Yang *et al* (2012), o qual expressou genes de um vegetal em leveduras da espécie *Pichia pastoris* para produção dessas enzimas.

A fitase descrita por Greiner *et al.* (2009) produzida por uma linhagem de *Aspergillus niger* mostrou-se mais ativa em pH 5, assim como a fitase de *P. variotii*, já a produzida por Jin-In *et al.* (2009) através de uma linhagem *Saccharomyces cerevisiae* apresentou pH ótimo de 3,6. Determinadas fitases podem apresentar dois picos de melhor ação catalítica, explicados provavelmente pela diferença na distribuição de cargas no sítio de ligação do substrato (Casey e Walsh, 2004). Essa situação foi comprovada por Ries (2010) que obteve pH ótimo em 3,0 e 5,6 com outra linhagem de *S. cerevisiae*, bem como Gosh (2011) que utilizando linhagem de *Rhizopus oryzae* descreveu os valores em 1,5 e 5,5. Em outro estudo foi relatada a produção de fitase pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*, a qual se mostrou mais ativa em meio reacional com pH 4,0 (Escobin-Mopera *et al.* 2012). Considerando as informações, deve-se destacar que a maioria das fitases conhecidas variam sua funcionalidade ótima nos valores ácidos de pH, porém, a fitase aqui produzida mostra propriedades mais amplas nesse quesito, tornando-a mais versátil para uma possível aplicação.

Nas figuras 13 e 14 está o perfil da atividade da fitase de *P. variotii* em relação à estabilidade em pH, assim como, a comparação entre os comportamentos das fitases comerciais, respectivamente.

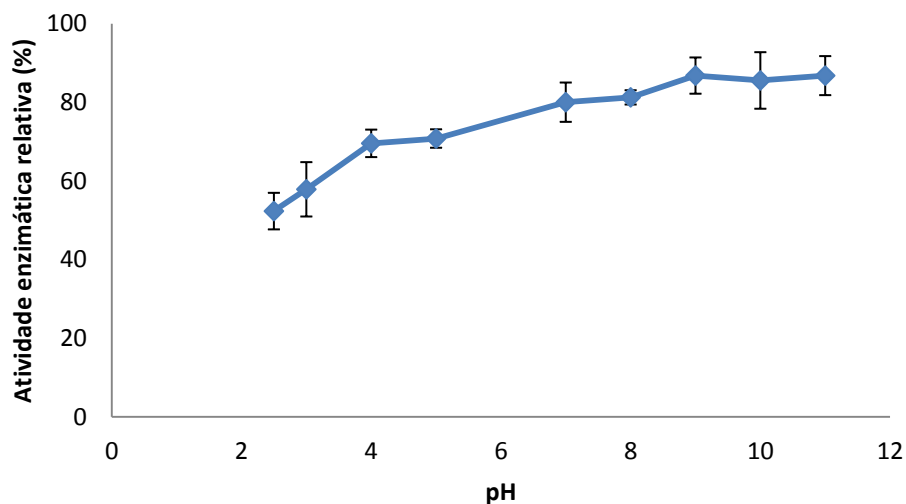


Figura 13: pH de estabilidade para atividade da fitase de *P. variotii*.

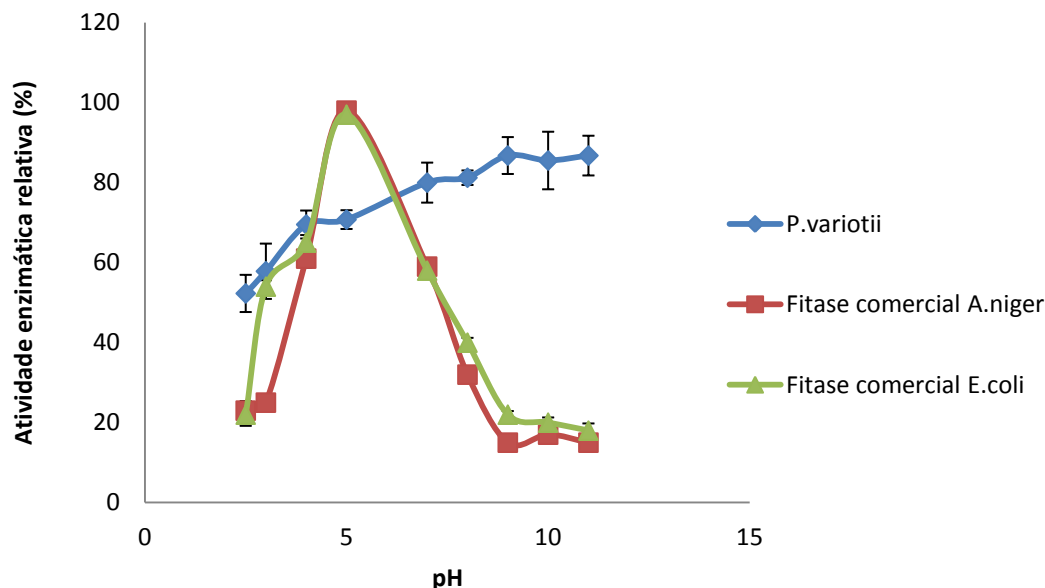


Figura 14: Comparação entre pH de estabilidade de atividade da fitase de *P. variotii* e das fitases comerciais de *A. niger* e *E.coli*.

A fitase de *Paecilomyces variotii* foi capaz de se manter relativamente estável na amplitude de estabilidade de pH estudada, sendo que a maior redução de atividade (50%) ocorreu na faixa de pH 2,5-3,0. Já nas condições de pH 4,0-6,0, foi mantido o rendimento de aproximadamente 70%. Da mesma forma que descrito no estudo de pH ótimo, o extrato enzimático de fitase microbiana produzido demonstrou alta afinidade por pHs alcalinos na faixa de 8,0-11,0, fato que pode ser explicado pela possível presença de enzimas distintas. Na figura 14, a comparação com as fitases comerciais mostra que estas possuem alta estabilidade apenas em pHs ácidos na faixa de 4,0-5,5 para a fitase comercial de *A.niger* e 3,0-5,5 para fitase comercial de *E.coli*.

A fitase de *Aspergillus niger* teve alta estabilidade na faixa de pH 3,0-8,0 sem perder quantidade significativa de sua atividade (Greiner *et al.*, 2009), de forma semelhante a linhagem de *Rizhopus orizae* manipulada por Gosh (2011) produziu a enzima sem perdas funcionais em pH 1,0-2,0 e na faixa de 2,5-9,5 com perda de 25%. Escobin-Mopera *et al.* (2012) não observaram redução da atividade da fitase produzida por *Klebsiella pneumoniae* 9-3B na faixa de pH 2,0-7,0. Porém, a partir de pH 8,0 a enzima declinou para apenas 20% de

atividade enzimática. Normalmente, as fitases fúngicas tendem a agir com maior rendimento em faixa de pH 2,0-5,0 (Garret *et al.*, 2004). Todavia, é importante a obtenção de enzimas com elevada amplitude funcional de pH, considerando a variação deste fator no trato gastrointestinal dos animais, principalmente em se tratando das funções intestinais, onde o pH ótimo das fitases geralmente é mais baixo que do meio reacional Cromwell (1991).

5.4.2 Determinação da temperatura ótima e da faixa de estabilidade da fitase de *P. variotii*.

A figura 12 representa o perfil da atividade de fitase de *Paecilomyces variotii* frente às diferentes temperaturas descritas no item 4.4.2. Bem como a figura 13 faz a comparação dessa característica junto às enzimas comerciais de *A.niger* e *E.coli*.

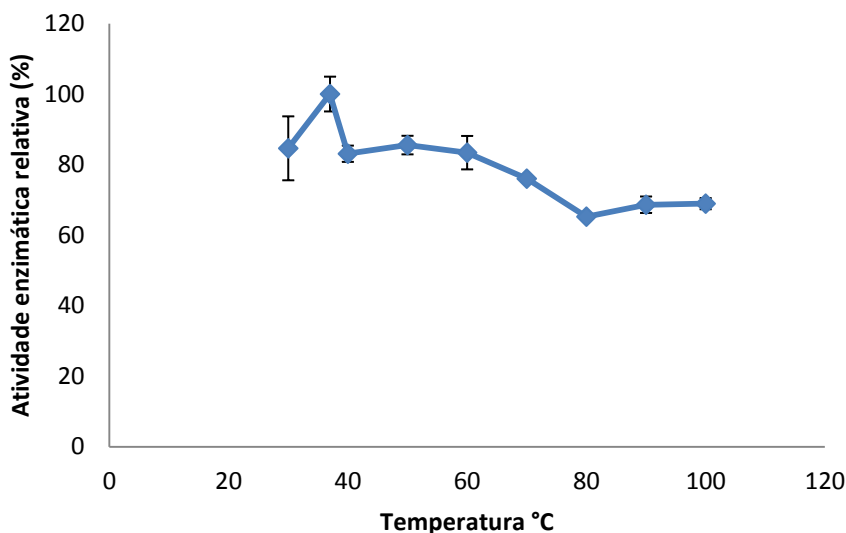


Figura 15: Temperatura ótima de atividade da fitase de *P. variotii*.

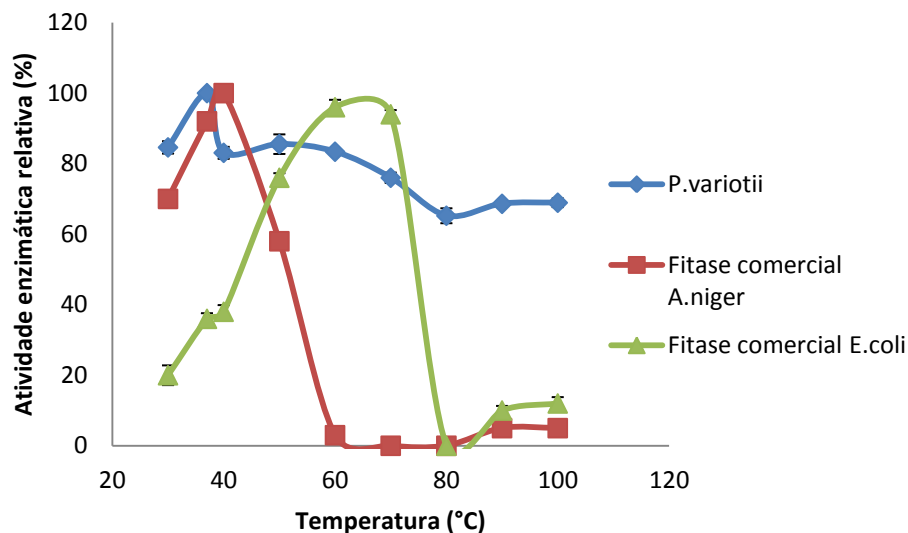


Figura 16: Comparação entre temperatura de ótica de atividade da fitase de *P. variotii* e das fitases comerciais de *A. niger* e *E. coli*.

De acordo com os dados da figura 15, o pico de maior capacidade de ação da enzima foi estipulado em 37°C. A literatura descreve fitases de diversas fontes que apresentam diferentes condições ótimas de temperatura, nesse caso para fins de comparação, a fitase produzida nesse trabalho é semelhante a enzima comercial de *A. niger*, a qual possui máxima funcionalidade em 40°C mas diferente da fitase comercial de *E. coli*, que apresentou temperatura ótima próxima aos 60°C.

As avaliações para estabilidade da fitase de *P. variotii* em diferentes temperaturas sugeriram dados interessantes para este trabalho. Através do perfil descrito pelo gráfico da figura 17, fica claro que a enzima pode atuar com atividade residual acima de 80% quando submetida a variações de temperatura de até 80°C, ou seja, mesmo em condições adversas a fitase teve redução de apenas 20% de rendimento. Além disso, é importante destacar que após 1 hora de incubação em temperaturas acima de 90°C essa enzima ainda manteve 60% de sua atividade. Por outro lado, as enzimas comerciais quando submetidas às mesmas condições não demonstraram tamanha capacidade, principalmente a comercial de *A. niger* que apresentou queda drástica de sua atividade residual em consequência dessas variações, enquanto a de *E. coli* foi capaz de manter bom rendimento até os 60°C.

De modo geral, grande parte das fitases conhecidas possuem melhor rendimento de sua atividade na faixa de 45-70°C, sendo que as de origem vegetal são mais susceptíveis a tratamentos térmicos (Ries, 2010), por outro lado, fitases microbianas tendem a ser mais termoestáveis (Konietzny e Greiner, 2002). Hassouni, H. et al.(2006) descreveram a produção da fitase pelo fungo *Miceliophthora thermophila* com atividade máxima nas temperaturas 45-50°C, mas insignificante para temperaturas acima de 70°C. Uma cepa de bactéria isolada a partir de águas residuais da Malásia foi capaz de sintetizar tal enzima com ação máxima em 65°C, e quando exposta 10 minutos a essa temperatura não teve perdas significativas, entretanto, quando exposta no mesmo tempo às temperaturas de 70°C e 80°C apresentou redução de 50% e 88% de sua funcionalidade, respectivamente (Greiner e Farouk, 2007). Já a levedura *Saccharomyces cerevisiae* produziu fitase com ampla estabilidade variando de 37°C à ebulição em 1 hora de incubação, com perdas de 40% de atividade para temperaturas acima dos 80°C (Ries, 2010). Um ano mais tarde Gosh (2011) publicou a fitase de *Rizhopus orizae* a qual demonstrou melhor atividade na temperatura ótima de 45°C e estabilidade 100% de retenção do seu rendimento para 50°C em 30min, para 60°C, 70°C e 80°C nas mesmas condições, a perda de atividade foi de aproximadamente 10% .

Assim, vale reforçar a importância das propriedades atribuídas à fitase de *Paecilomyces variotii* neste estudo, considerando os diferentes protocolos de processos industriais existentes de acordo com a necessidade em trabalhar temperaturas mais brandas ou mais intensas, assim como pHs mais ácidos ou alcalinos.

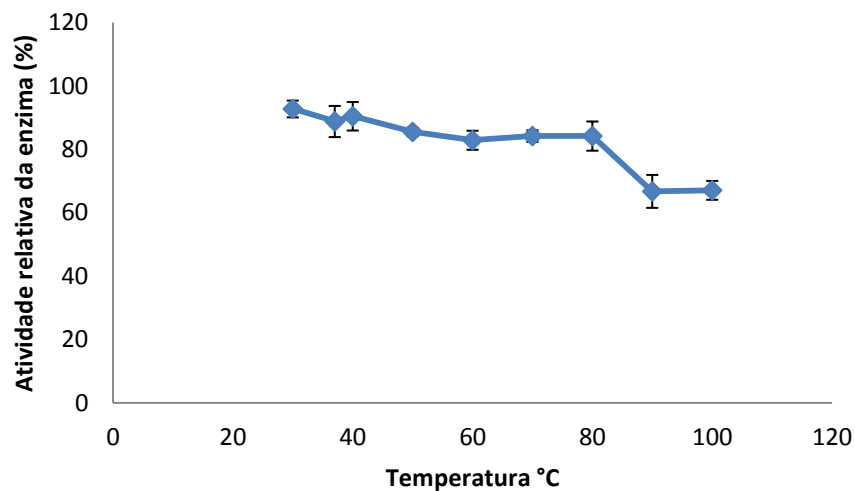


Figura 17: Temperatura de estabilidade de atividade da fitase de *P. variotii*.

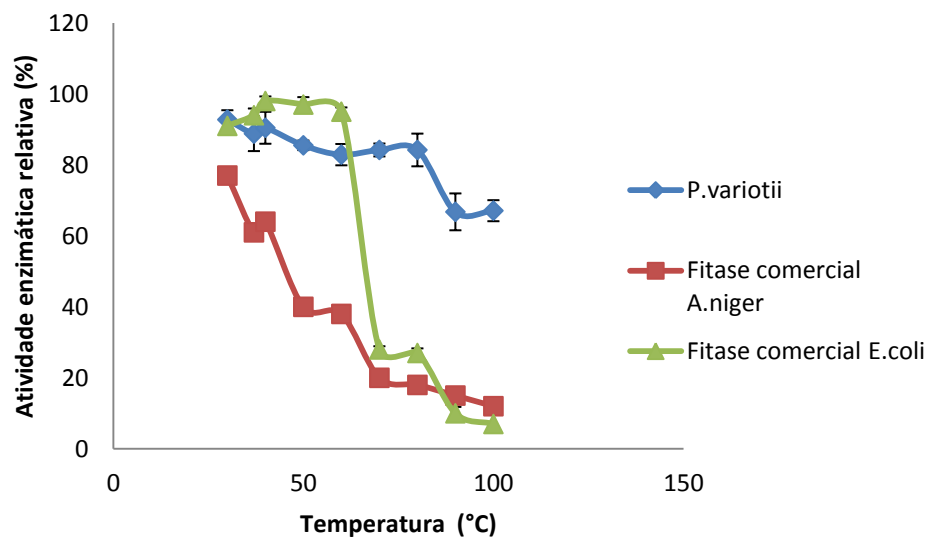


Figura 18: Comparação entre temperatura de estabilidade de atividade da fitase de *P. variotii* e das fitases comerciais de *A. niger* e *E.coli*.

5.4.3 Avaliação da influência de sais e inibidores na atividade do extrato bruto de fitase.

A tabela 16 descreve os efeitos de cada sal frente a funcionalidade da enzima nas concentrações de 1mM e 10mM.

Tabela 16: Efeitos de sais e inibidores na atividade da fitase de *Paecilomyces variotii*.

Atividade relativa de fitase em extrato bruto (%) de <i>Paecilomyces variotii</i>		
Concentração	1mM	10mM
Sal		
controle	100 ^{ab}	100 ^a
CaCl ₂	89,59 ^b	77,05 ^d
ZnSO ₄ .7H ₂ O	76,54 ^d	60,94 ^e
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .H ₂ O	78,16 ^{dc}	66,73 ^e
FeSO ₄ .7H ₂ O	83,30 ^c	86,81 ^c
CuSO ₄ .5H ₂ O	91,01 ^b	88,81 ^{bc}
MnSO ₄ .H ₂ O	92,12 ^b	79,99 ^{dc}
Na ₂ SO ₄	107,32 ^a	92,11 ^b
Li ₂ SO ₄ .H ₂ O	97,01 ^{ab}	80,18 ^{dc}
BaSO ₄	91,43 ^b	78,64 ^d
HgCl ₂	100,33 ^a	100,33 ^a
MgSO ₄ .7H ₂ O	89,41 ^b	77,48 ^d
KCl	76,68 ^d	99,57 ^a
EDTA	134,93 ^e	140,92 ^f
K ₂ HPO ₄ /Na ₂ HPO ₄	207,93 ^f	158,51 ^g

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si quando avaliadas estatisticamente (teste Tukey $p < 0,05$).

Os íons Na⁺, Li⁺, Hg⁺³, Ca⁺², Cu⁺, Mn⁺, Ba⁺² e Mg⁺² não causaram perdas significativas da atividade enzimática quando adicionados na concentração de 1mM no meio reacional. Por outro lado, quando adicionados nas mesmas condições os íons Fe⁺², Fe⁺³, Zn⁺² e K⁺ mostraram-se significativamente prejudiciais a funcionalidade da fitase, acarretando perda na faixa de 20 a 25% de atividade. Quando aumentada a concentração dos sais avaliados para 10mM, observou-se que apenas K⁺ e Hg⁺³ foram insignificantes no meio de reação, enquanto

os íons Na^+ , Li^+ , Cu^+ , Mn^+ , Ba^{+2} e Mg^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} causaram perdas de 10 a 25% de atividade enzimática. Os íons metálicos Fe^{+3} , Zn^{+2} causaram perdas ainda mais drásticas na ação da enzima, com redução em 40% da atividade relativa. Outros dois compostos adicionados foram o EDTA e a mistura de sais de fósforo ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$). O primeiro causou aumento da atividade enzimática em 35% e 40% respectivamente nas concentrações 1mM e 10mM, assim como o descrito por Gosh et al. (2011) com a fitase de *Rizhopus orizae*. A adição $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ dobrou a atividade da fitase quando adicionado em 1mM, sendo que em 10mM tal ação foi reduzida em 50%.

A fitase sintetizada por *Aspergillus niger* 11T53A9 não apresentou efeito de ativação em presença de íons metálicos, sendo que na adição de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , nas mesmas concentrações citadas anteriormente, não houveram interferências significativas, diferente de quando foram adicionados os íons Fe^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} , os quais foram responsáveis por severa perda de atividade, que pode ser explicada pela diminuição de substrato do meio reacional, pois é comum a formação do complexo Fe-fitato, incapacitando a ação enzimática (Greiner et al., 2009). Escobin-Mopera et al. (2012) observou que a fitase de *Klebsiella pneumoniae* 9-3B sofreu inibição por todos os íons metálicos quando adicionados na concentração de 5mM e apenas o Ca^{+2} não influenciou na ação enzimática quando utilizado a 1mM, da mesma maneira que o EDTA, o qual não teve efeito sobre a enzima.

5.5 Detoxificação da torta de tungue em FES por *Paecilomyces variotii*.

5.5.1 Quantificação dos ésteres de forbol por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em torta de tungue.

Com o objetivo de avaliar a capacidade do fungo *Paecilomyces variotii* em degradar o composto tóxico Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA), característico de plantas da família Euforbiáceas, foram realizados os testes de quantificação e de citotoxicidade da torta de tungue antes e após fermentação em estado sólido.

Na tabela 17 estão descritas as concentrações experimentais referentes ao subproduto sem processamento (NF - não fermentado), com tratamento térmico em autoclave (NFA - Não

fermentado autoclavado) e os fermentados em diferentes períodos, obtidos por HPLC. Nas figuras 19 e 20 estão representados os cromatogramas com os picos de detecção da toxina de interesse.

Tabela 17: Concentração de éster de forbol na torta de tungue antes e após fermentação em estado sólido.

Tempo Fermentação(h)	Concentração éster de forbol($\mu\text{g/mL}$)
Torta de tungue não fermentada ^a	1,06 \pm 0,005
Torta de tungue não fermentada Autoclavada ^a	1,08 \pm 0,07
Torta de tungue Fermentada 48 ^b	0,1 \pm 0,19
Torta de tungue Fermentada 72 ^b	0,13 \pm 0,2
Torta de Tungue Fermentada 96 ^b	0
Torta de Tungue Fermentada 120 ^b	0

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre si quando avaliadas estatisticamente (teste Tukey $p < 0,05$).

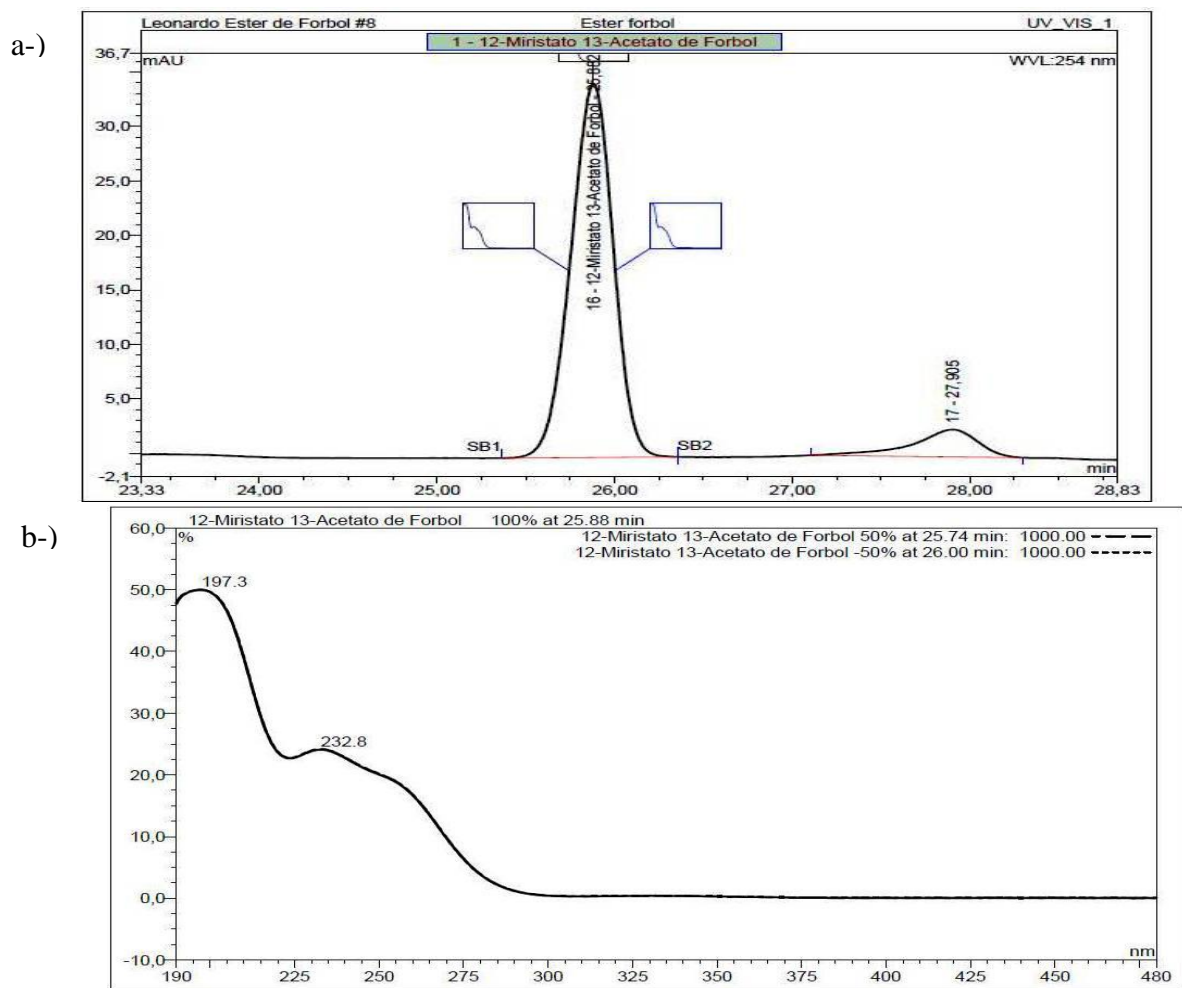
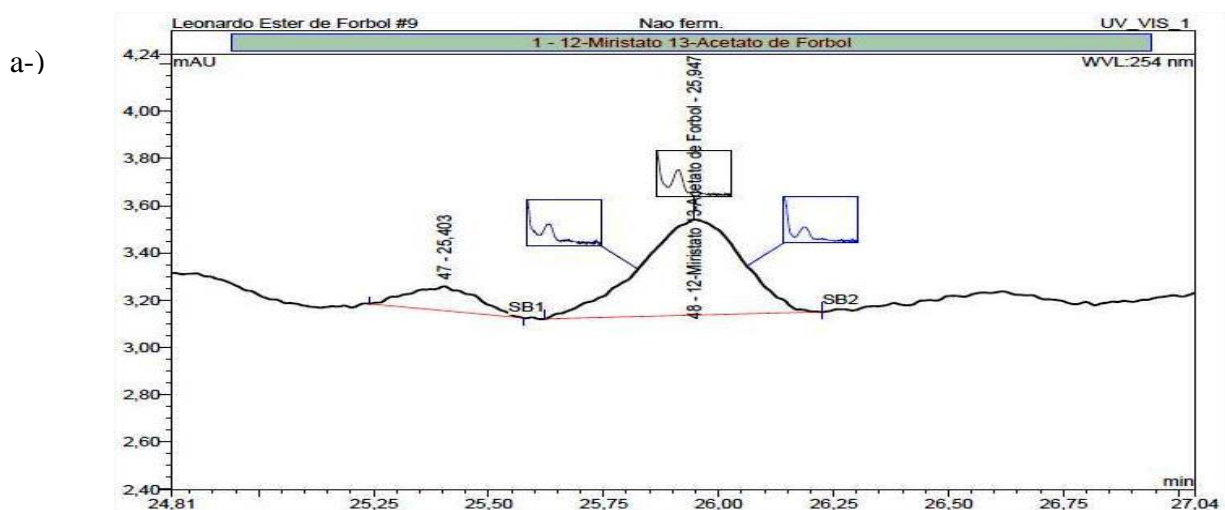


Figura 19: Cromatograma da corrida em cromatografia líquida de alta eficiência do padrão Forbol-12-Miristato-13-Acetato (a) e seu espectro de detecção (b).



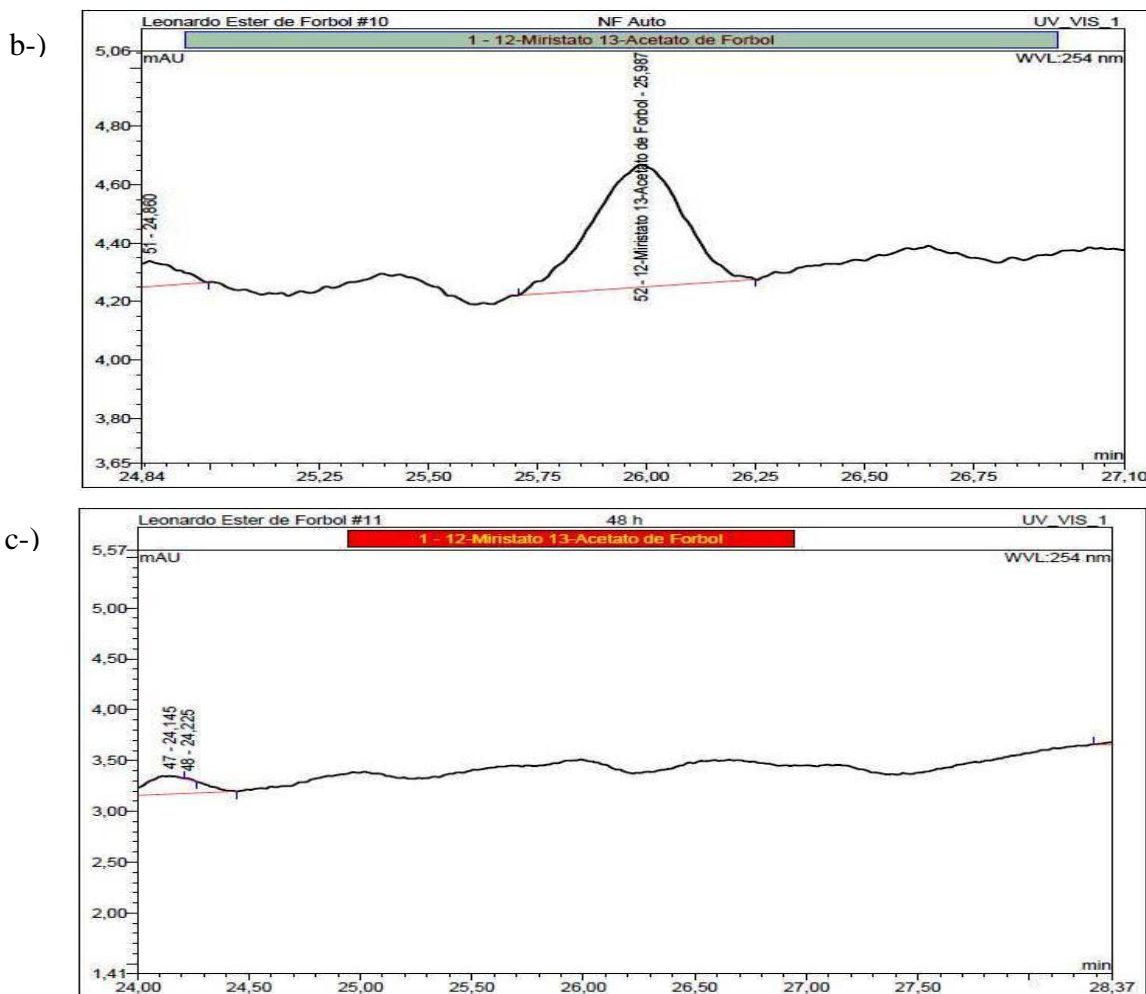


Figura 20: Cromatograma de análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos ésteres de forbol das amostras não fermentada (a), não fermentada autoclavada (b) e 48horas (c) de fermentação.

Avaliando os dados obtidos através das corridas feitas em cromatografia líquida de alta eficiência, é observado que o coproduto utilizado como meio de cultivo do fungo, quando não exposto ao processo fermentativo apresentou concentrações significativas de forbol. A torta de tungue original, sem tratamento, apresentou concentração de éster de $1,06\mu\text{g/ml}$, assim como no resíduo de tungue NFA que obteve $1,08\mu\text{g/ml}$. Por outro lado, quando utilizada para crescimento do *P. variotii* nos tempos de 48,72,96 e 120 horas e, submetida as corridas em HPLC, não foram detectadas quantidades significativas do composto tóxico.

Com o crescimento da necessidade de produção de óleos para as indústrias de energia renovável, muitos trabalhos tem surgido para encontrar novas fontes viáveis deste produto e,

consequentemente também ocorre o aumento de resíduos agroindustriais, sendo que vários deles, da mesma maneira que o tungue, podem apresentar componentes tóxicos em sua composição. Madeira Jr. et al.(2011) trabalhou com o subproduto da extração de óleo da mamona, vegetal esse, que possui a proteína altamente tóxica ricina. Manipulando a mesma linhagem de *P. variotii* foi constatada o desaparecimento das bandas referentes á essa toxina após um período de 48 horas de FES, pelo método de eletroforese capilar. Outro estudo publicado recentemente foi a detoxificação de ésteres de forbol do resíduo proveniente da extração de óleo das amêndoas de pinhão manso (*Jatropha curcas*), nesse trabalho, através de ensaios por HPLC foi determinada a degradação do forbol após um período de 9 dias de crescimento do micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* PseA (Joshi et al., 2011).

5.5.2 Avaliação dos efeitos de citotoxicidade da torta de tungue antes e após tratamento por *P.variotii*.

Através dos ensaios por HPLC, foi observada a degradação do éster de forbol de acordo com o aumento do tempo de fermentação. Entretanto, a não detecção desse composto não confirma que o coproduto de tungue deixou de ser nocivo. Considerando a possível utilização desse subproduto agroindustrial para suplementação de rações, deve haver alto grau de liberdade para afirmar que o produto em questão não venha a afetar os animais que o ingerissem. Portanto, foram realizados ensaios biológicos in vitro por meio do teste de atividade da desidrogenase mitocondrial (MTT), para analisar se a torta de tungue fermentada apresentava toxicidade às células de camundongo RAW 264,7.

Foi avaliado o crescimento celular de acordo com as concentrações* de éster de forbol adicionadas a cada ensaio frente ao controle em que não houve adição da toxina, sempre realizados em triplicatas.

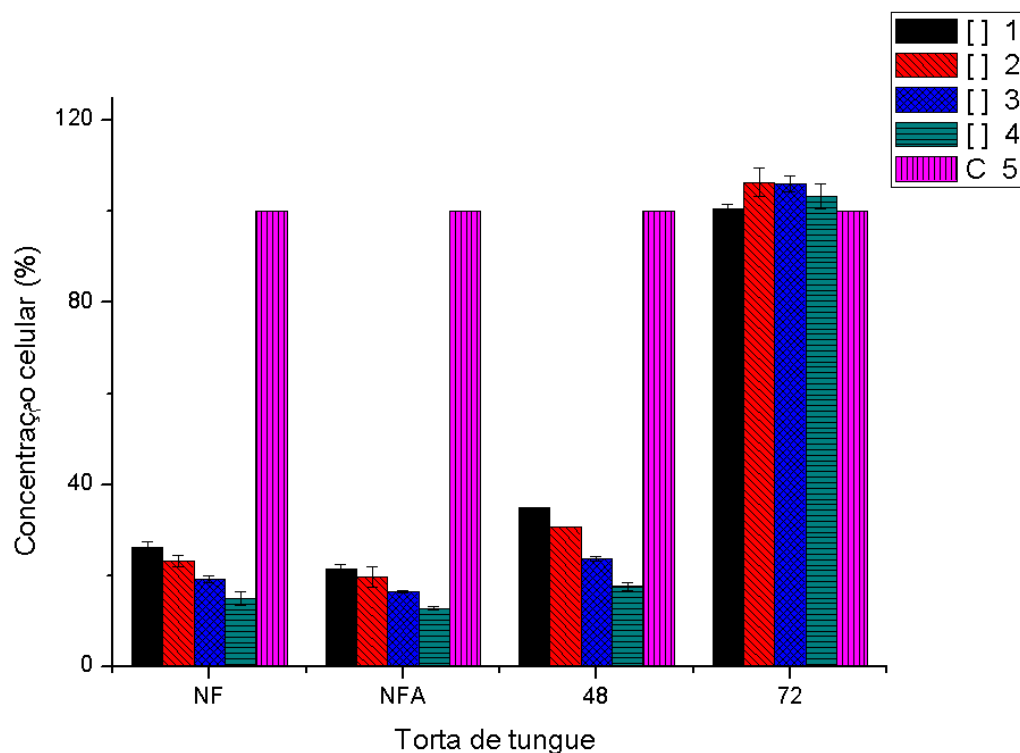


Figura 21: Crescimento celular em relação à concentração de forbol referente as amostras não fermentadas(NF e NFA) e fermentadas(48 e 72 horas).

* Concentrações([]) testadas (4)3,75ug/ml, (3)2,5ug/ml, (2) 1,25ug/ml e (1) 0,625ug/ml não demonstraram diferença estatística significativa entre si em relação ao seu poder de citotoxicidade.

Na análise do gráfico de crescimento celular (Figura 21), observa-se que o extrato de forbol quando presente em qualquer concentração foi inibidor do desenvolvimento dos macrófagos. Comparando as barras das diferentes concentrações nota-se um leve padrão de aumento da toxicidade com o aumento da concentração de toxina, porém, estatisticamente os dados não apresentaram diferenças significativas para as amostras dos extratos NF e NFA, sendo que em 48 horas é mostrado um ligeiro aumento do crescimento celular, mas ainda relevantemente prejudiciais ao crescimento celular. Contudo, após 72 horas de fermentação, pode-se observar que as células cresceram de forma equiparada ao controle, ou seja, depois desse período de tratamento microbiológico foi constatada a detoxificação dos ésteres de forbol presentes na torta de tungue. Resultado semelhante foi apresentado na detoxificação de torta de mamona por *P. variotii* em que foi observado o desaparecimento das bandas referentes à

proteína tóxica ricina, durante análise por eletroforese capilar, após 72 horas de FES (Madeira Jr. et al., 2011).

6 Conclusões

A produção da fitase através da fermentação em estado sólido utilizando o resíduo agroindustrial torta de tungue apresentou mais que o dobro da atividade inicial após a conclusão dos experimentos de otimização do processo de fermentação.

Em relação à caracterização do extrato bruto enzimático foi constatada a versatilidade da fitase sintetizada pelo fungo *Paecilomyces variotii*. Nesses experimentos, foi possível submeter a enzima a uma extensa faixa de pH e temperatura sem que houvesse reduções drásticas de sua atividade. Observando pH e temperatura ótimos de 5,0 e 37°C respectivamente, já as estabilidades em pH e temperatura na faixa 4,0-11,0 e 30°C - Ebulição.

Nos estudos de detoxificação do subproduto torta de tungue, as análises por HPLC mostraram que após o período de 48 horas de fermentação, não foi possível detectar os ésteres de forbol. Após 72 horas de fermentação o teste de citotoxicidade (MTT), mostrou o crescimento (*in vitro*) normal das células de camundongo. Portanto, foi possível afirmar que o tratamento microbiológico foi, também, bem sucedido para detoxificar a torta de tungue.

Concluindo, a produção de fitase por *P. variotii* foi máxima de 9.56 U/gss após 72 horas de fermentação a 30°C sendo o mesmo processo efetivo para detoxificação da torta de tungue.

7 Bibliografia

ALMEIDA E SILVA, J.B., MANCILHA, I.M., VANETTI, M.C.D. AND TEIXEIRA, M.A. Microbial Protein Production by *Paecilomyces varioti* Cultivated in Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysate. *Bioresource Technology*, 52, 197-200 (1995).

ALVARENGA, R.R.; ZANGERONINO, M.G. Adição de fitase em rações para frangos de corte. *PUBVET, Public. Medic. Vet. Zootec.*, v.17, artigo 347, 2008.

AREGHEORE, E.M.; BECKER, K.; MAKKAR, H.P.S. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. *S. Pac. J. Nat. Sci.* 21, 50–56, 2003.

ARNASON, J.; IMSLAND, A. K.; GÚSTAVSSON, A.; GUNNARSSON, S.; ARNARSON, I.; REYNISSON, H.; JÓNSSON, A. F.; SMÁRADÓTTIR, H.; THORARENSEN, H. Optimum feed formulation for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Minimum protein content in diet for maximum growth. *Aquaculture* 291, p. 188-191, 2009.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98, p. 1832-1837, 2007b.

BENNETT, P.; YANG, S-T. Beneficial effect of protracted sterilization of lentils on phytase production by *Aspergillus ficuum* in Solid State Fermentation. *Biotechnology Progress*. btpr 12-0129. 2012.

BEZPROZVANNY, I.; WATRAS, J.; AND EHRLICH, B. E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351, 751–754, 1991.

BLUMBERG, P.M. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters. *Cancer Res.* 48, 1–8, 1998.

BRADFORD, M. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254, 1976.

CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology* 40, p.497-507, 2007.

CARTER, C. G.; HAULER, R. C. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 185, p. 299-311, 2000.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.*, v.110, p.313-322, 2004.

COSGROVE, D.J. Inositolhexakisphosphates. In: Cosgrove, D.J. (Ed.), Inositol phosphates. Their Chemistry, Biochemistry and Physiology. *Elsevier Scientific Publishing Company*, Netherlands, pp. 26–43, 1980.

CROMWELL, G. L.; COFFEY, R. D. P—a key essential nutrient, yet a

possible major pollutant. Its central role in animal nutrition, p. 133. In T. PLYONS (ed.), Bio/technology in the feed industry. *Proceedings of the Alltech 7th Annual Symposium*. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Ky, 1991.

DAVIES, N.T. Effects of phytic acid on mineral availability. In Dietary Fiber in Health and Disease. Vahoun, G. V. and Kritchevsky, D., Eds., Plenum Press, New York, pp.105-116, 1980.

DYER, J.M., CHAPITAL, D.C., KUAN, J.-C.W., SHEPHERD, H.S., TANG, F., AND PEPPERMAN, A.B. Production of linolenic acid in yeast cells expressing an omega-3 desaturase from tung (*Aleurites fordii*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 647–651, 2004.

DVORÁKOVÁ, J. Phytase: Sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiologica* 43, Issue 4, p.323-338, 1998.

EVANS, F. J. Naturally occurring phorbol esters. *Boca Raton, FL: CRC Press*, 1986.

GARRETT, J.B.; KRETZ, K.A.; O'DONOGHUE, E.; KERUVUO, J.; KIM, W.; BARTON, N.R.; HAZLEWOOD, G.P.; SHORT, J.M.; ROBERTSON, D.E.; GRAY, K.A. Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3041–3046, 2004.

GOEL G, MAKKAR HPS, FRANCIS G, BECKER K. Phorbol esters: structure, occurrence and biological activity. *Int J Toxicol* 26:279–288, 2007.

GOEL, G.; PUNIYA, A. K.; AGUILAR, C. N.; SINGH, K. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 92, p. 497-503, 2005.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I.; ALVAREZ-GARCÍA, N.; HERNÁNDEZ-ANDALUZ, J. L. Instantaneous determination of crude proteins, fat and fibre in animal feeds using near infrared reflectance spectroscopy technology and remote reflectance fibre-optic probe. *Animal Feed Science and Technology* 128, p. 165-171, 2006.

GRANGEIRO, M.G.A.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; ESPINDOLA, G.B., SOUZA, F.M. Inclusão da levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v.30, p.766-773, 2001.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R. E. Enzyme production by solid-state

fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 144, p. 1-22, 2008.

GREINER, R., KONIETZNY, U., AND JANY, KL.-D. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 107–113, 1993.

GREINER, R., HALLER, E., KONIETZNY, U., JANY, K.D. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341 (2), 201–206, 1997.

GRUSZYNSKI, C.; ANGHINONI, I.; MEURER, E. J.; KÄMPF, A.N. Misturas de casca de tungue e casca de arroz carbonizada no enraizamento de *Dendranthema morifolium* Tzevelev ‘golden polaris’ sob método de transpiração. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas - SP, v. 9, n. 1, p. 63/70, 2003.

HÉRVAS, G.; FRUTOS, P.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R.; DEL PINO, M. C. A. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology* 109, p. 65-78, 2003.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 175–186, 2004.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of clinical fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000.

HONG, K.; MA, Y.; LI, M. Solid-state fermentation of phytase from cassava dregs. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93, p. 777-785, 2001.

IVORRA, I.; GIGG, R.; IRVINE, R. F.; PARKER, I. *Biochem. J.* **273**, 317–321, 1991.

JIN-IN, M.; WON-SEO, S.; KIM, D. C.; SOON-OH, N. Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. *Process Biochem.*, v.44, p.122-126, 2009.

JOSHI, C., MATHUR, P., KHARE, S. K. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. *Bioresource Technology* 102, 4815–4819, 2011.

KAUTZ, J.; LYSYK, G.; D’OCA, M. G. M.; CLEMENTIN, R.M. Extração do óleo de tungue (*Aleuritis fordii*) para produção de biodiesel. *Simpósio estadual de agroenergia e reunião técnica anual de agroenergia do RS*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

KEROVUO J; LAPPALAINEN I; REINIKAINEN T. The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochem Biophys Res Comm* ;268:365–9, 2000.

KIES, A. K.; VAN HEMERT, K. H. F.; SABER, W. C. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilization. *World's Poult Science Journal* 57, p. 109- 126, 2001.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, p. 345-351, 2002.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; TRIPATHI, K. K.; SAXENA, R. K.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms as an alternative source of protein. *Nutrition Reviews* 55, p. 65-75, 1997.

LAITNEN, H. A.; BOYER, K. W. Automobile exhaust particulates properties of environmental significance. *Environmental Science and Technology* 279, p. 457-1086, 1975.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25, p. 1787-1794, 2003.

LEI, X. G.; STAHL, C. H. Nutritional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy. *Journal of Applied Animal Research* 17, p. 97-112, 2000.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. *Advances in Applied Biochemistry and Microbiology* 44, p. 215-260, 1997.

LIU, B.-L., RAFIQ, A., TZENG, Y.-M., ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Technol.*, v.22, p.415-424, 1998.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. Myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* 150, 1–19, 2000

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais. *Ciência e Agrotecnologia* 29, p. 833-838, 2005.

MADEIRA, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 102, 7343–7348, 2011.

MAKKAR, H.; MAES, J.; GREYT, W.D.; BECKER, K. Removal and degradation of Phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 173–181, 2009.

MANN, G. E.; HOFFMAN, L.V. H. JR.; AMBROSE, A. J. *AGR. Foodchem.* 2, 258, 1954.

MITCHELL, D. A.; LOSANE, B. K. Definition, characteristic and potential. In: Doelle, H.; Mitchell, D. A., Rols, C. E. Solid substrate cultivation. *Elsevier Applied Science*, p. 1-16, 1992.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55– 63, 1983.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; SHIOTA, N; NOBUHARA, J. *Phytochem.* 14, 2304, 1975.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal* 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A., SZAKACS, G., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ, A., SOCCOL, V.T. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology.* 77, 203–214, 2001.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., MITCHELL, D.A. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35, 1153–1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 41, 379–390, 1998.

PARIZA, M. W.; COOK, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56, p. 332-342, 2010.

PALLAUF, J.; RIMBACH, G. Nutritional Significance of Phytic Acid and Phytase. *Arch. Anim. Nutr.*, 50: 301-319, 1996.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiological Biotechnologic* 67, p. 577-591, 2005.

POTTER, B.V.L. Recent advances in the chemistry and biochemistry of inositolphosphates of biological interest. *Nat. Prod. Rep.* 7, 1–23, 1990.

PRETTO, A. Resposta nutricional do Jundiá (*Rhanda quelen*) alimentado com farelos vegetais após a inativação de antinutrientes. Tese apresentada ao Curso de

Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). 2013.

BRADSTREET, R.B. The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. *Academic Press*, New York, 1965.

RABOY, V. Molecules of interest: *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64, p. 1033-1043, 2003.

RABOY, V. Accumulation and storage of phosphate and minerals. In: Larkins, B.A., Vasil, I.K. (Eds.), *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*. *Kluwer Academic Publishers*, pp. 441–477, 1997.

RANI, R., GOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. *Bioresource Technology* 102, 10641–10649, 2011.

REDDY, N. R.; PIERSON, M. D., SATHE, S. K.; SALUNKE, D. K. Phytates in Cereals and Legumes. *CRC Press*, Boca Raton, FL, 1989.

REDDY, N.R.; PIERSON, M.D. Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food Res. Int.* 27: 281- 290, 1994.

REMUS, J. A avicultura e o meio ambiente colhem os benefícios da nova geração de fitases. *Rev. AveWorld - Edição 27*, publicado em 28/05/2008, disponível em <http://www.aveworld.com.br/index.php/documento/3749>, acessado em 30/04/2010.

RIES, E. F.; MACEDO, G. A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Science and Biotechnology* 18, p. 655-660, 2009.

SA, L.M. Ingredientes alternativos na alimentação de suínos – economia e segurança. *Polinutri*, publicado em setembro/2005, disponível em http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_setembro_05.htm, acessado em 06/01/2010.

SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 319–324, 2010.

SANTOS, T. Optimization of phytase production by *Aspergillus niger* using Solid State Fermentation. A thesis submitted to the National University of Ireland for degree of Master Science. 2011.

SHIMIZU M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci Biotech Biochem*; 56: 1266–9, 1992.

SHNEIDER, M. Análise Físico Química da Torta de Tungue. 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

SILINSKY, E. M.; T. J. SEARL, T.J. Phorbol esters and neurotransmitter release; more than just protein kinase C? *Br. J. Pharmacol* 138:1191–1201, 2003.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44, p. 13-18, 2009.

SOCCOL C.R.; KRIEGER N. Brazilian experiments for the valorization of agro-industrial residues by solid state fermentation. In: Pandey A, editor. *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Educational Publishers, 25–40, 1998.

SONNTAG, N.O.V. Structure and Composition of Fats and Oils", Bailey's Industrial Oil and Fat Products". *John Wiley and Sons*, New York, 1979.

SUN, Z.T.; LIU, C.; DU, J.H. Optimization of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology. *Ann. Microbiol.* 58, 683–690, 2008.

VASTA, V.; NUDDA, A.; CANNAS, A.; LANZA, M.; PRIOLO, A. Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 147, p. 223-246, 2008.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An Overview. *Enzyme and Microbial Technology* 35, p. 3-14, 2004.

VAUGHAN, J.C. The structure and utilization of oil seeds. London: Chapman & Hall. 279p, 1970.

VINIEGRA GONZÁLEZ, G.; FAVELA TORRES, E.; NOE AGUILAR, C.; JESÚS ROMERO GÓMEZ, J.; DÍAZGODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* 13, 157–167, 2003.

YANG, M.; JOHNSON, S. C.; MURTHY P. P. N. Enhancement of alkaline phytase production in *Pichia pastoris*: Influence of gene dosage, sequence optimization and expression temperature. *Protein Expression and Purification*, 84 247-254, 2012.

WINK, M.; GRIMM, C.; KOSCHMIEDER, C.; SPORER, F.; BERGEOT, O. Sequestration of phorbolesters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Chemoecology* 10, 179–184, 2000.

WODZINSKI, R. J.; ULLAH, A. H. J. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**, 263-302, 1996.

WWW.IBGE.GOV.BR (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola), Acessado 23/11/2012.